

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicině

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



MUDr. Filip Kramář

Nestabilita genomu buněk mozkových nádorů.

Korelace klinických, morfologických a molekulárně-cytogenetických dat

Brain Tumor Cells Genome Instability

Correlation of clinical, morphological and molecular-cytogenetic data

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Prof. Ing. Kyra Michalová, DrSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne 29.5.2012

Filip Kramář

Podpis

Identifikační záznam:

KRAMÁŘ, Filip. *Nestabilita genomu buněk mozkových nádorů.* [*Brain Tumor Cells Genome Instability*]. Praha, 2012. 158 s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK. Vedoucí závěrečné práce Michalová, Kyrá.

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří jakýmkoliv způsobem přispěli k vytvoření této disertační práce. Můj dík patří především prof. Ing. Kyře Michalové, DrSc., za laskavý a trpělivý přístup, pomoc při volbě tématu, za odborné vedení a cenné rady při přípravě disertační práce. Dále bych chtěl poděkovat doc. RNDr. Zuzaně Zemanové, CSc. za pomoc a spolupráci na tomto projektu. Prof. MUDr. Vladimíru Benešovi děkuji za trvalou podporu a vytvoření podmínek pro práci na projektu. Vřelý dík patří celé mé rodině za trpělivost a morální podporu.

Abstrakt:

Mozkové gliomy jsou primární mozkové nádory. Nejčastěji se jedná o nádory astrocytární a oligodendroglální řady. Již dříve bylo prokázáno, že v nádorových buňkách mozkových gliomů se vyskytují některé nenáhodné chromosomové aberace. Cílem této práce bylo pomocí fluorescenční in-situ hybridizace (FISH) na vzorcích mozkových nádorů získaných při operaci stanovit frekvenci určených chromosomových aberací pomocí vybraných centromerických a lokus specifických sond a získaná data porovnat s klinickými a morfologickými údaji. V průběhu 6 let jsme získali celkem 270 vzorků, u 264 jsme provedli FISH pomocí panelu námi zvolených sond. Tyto získané výsledky jsme pak porovnali s histologickou analýzou odebraných vzorků a vybranými klinickými údaji (věk, Karnofsky skóre, rozsah resekce, celkové přežití). Celý soubor jsme rozdělili na 7 skupin dle histologické diagnózy. V každé skupině jsme stanovili medián a průměrnou dobu přežití, poté jsme u vybraných parametrů sledovali jejich vliv na celkovou dobu přežití pomocí Kaplan-Meierovy analýzy. U některých diagnóz jsme vytvořili Coxův regresní model se stanovením rizika příslušného parametru. U difuzních a anaplastických astrocytomů a anaplastických oligodendrogliomů stoupá riziko rychlé progrese a upgradingu na nádor vyššího grade při nálezů jiných aberací (především amplifikace EGFR, delece RB1, monosomie chromosomu 10, trisomie chromosomu 7, delece CDKN2A). Tito pacienti jsou sledováni v kratších časových intervalech. U glioblastomu je polyploidie pozitivním prognostickým ukazatelem, monosomie chromosomu je 10 spojena se špatným klinickým průběhem a extrémně krátkou i celkovou dobou přežití. Kombinovaná delece 1p/19q je prognosticky příznivým ukazatelem u nádorů s oligodendroglální komponentou.

Klíčová slova:

Gliom – FISH – delece – amplifikace – monosomie – trisomie – polyploidie - celkové přežití

Abstract:

Gliomas are brain tumors arising from neuroglia. In most cases astrocytic or oligodendroglial component is the main element of the tumor. Non-random chromosomal aberrations are found in tumor cells as was revealed previously. The aim of this study was a fluorescence in-situ hybridisation analysis (FISH) of tissue samples obtained during neurosurgical procedures, determine the frequency of selected chromosomal aberrations, further correlation with morphological and clinical data and statistical analysis of the results. During six years 264 tissue samples were gained in which FISH with defined probes was performed. The acquired results were compared with histological analysis and selected clinical data (age, Karnofsky score, extent of resection, overall survival). The whole series was divided into 7 groups by tumor type for further statistical analysis. In every group median and mean survival time was calculated, Kaplan-Meier analysis was focused on influence of selected parameters to overall survival. In some categories Cox regression model was created to achieve a hazard ratio of selected parameters. In WHO Grade II and III tumors the risk of malignant progression and tumor upgrading is significantly higher in comparison with samples where specific aberrations were not found (EGFR amplification, CDKN2A and RB1 deletion, monosomy of chromosome 10 and trisomy of chromosome 7). In glioblastoma polyploidy is good prognostic marker, monosomy of chromosome 10 is linked to worse clinical course and short overall survival.

Keywords:

Glioma – FISH – deletion – amplification – monosomy – trisomy – polyploidy - overall survival

Obsah:

Úvod do problematiky	10
p53	11
Rb1	11
Růstové faktory (GF), cesta PI3-kináza/Akt	12
Astrocytární nádory	13
Oligodendrogliální nádory	14
Hypotéza	16
Materiál a metodika	17
Výsledky	19
Pilocytický astrocytom WHO Grade I	20
Difuzní astrocytom WHO Grade II	21
Anaplastický astrocytom WHO Grade III	25
Multiformní glioblastom WHO Grade IV	30
Oligodendrogliom WHO Grade II	37
Anaplastický oligodendrogliom WHO Grade III	39
Anaplastický astrocytom WHO Grade III	45
Diskuze	48
Závěry	59
Použitá literatura	61
Obrazová příloha	67
Zdrojové tabulky	73
Vlastní publikace	93

Seznam zkratek:

<i>BRAF</i>	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
<i>CCND1</i>	cyclin D1
<i>CCND2</i>	cyclin D2
<i>CCND3</i>	cyclin D3
<i>CDKN2A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<i>CDKN2B</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
<i>CDKN2C</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C
CEP	centromerická sonda
CGH	komparativní genomová hybridizace
<i>E2F</i>	E2F transcription factor 1
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor
<i>ERBB2</i>	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
FISH	fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace
FLT-PET	pozitronová emisní tomografie s fluorothymidinem
<i>GABRA1</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1
GBM	glioblastom
HE	hematoxylin-eosin
I-FISH	fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace na interfázních jádrech
<i>IDH1</i>	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+)
<i>IDH2</i>	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+)
KPS	Karnofsky skóre
LOH	ztráta heterozygosity
LSI	lokus-specifická sonda
<i>MDM2</i>	p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog
<i>MDM4</i>	p53 binding protein homolog
<i>MET</i>	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MRI	magnetická rezonance
<i>NEFL</i>	neurofilament, light polypeptide
<i>NF1</i>	neurofibromin 1
<i>OLIG2</i>	oligodendrocyte lineage transcription factor 2
OS	celkové přežití
<i>RB1</i>	retinoblastoma 1
<i>p14^{ARF}</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (alternate reading frame)
<i>PDGFRB</i>	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
<i>PDGFRA</i>	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
<i>PIK3CA</i>	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PIP2	fosfatidyl inositol difosfát
PIP3	fosfatidyl inositol trifosfát
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog
SG	zelený signál
<i>SLC12A1</i>	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 1

SO	oranžový signál
<i>SYT1</i>	synaptotagmin I
<i>TP53</i>	tumor protein p53
WHO	Světová zdravotnická organizace

1. Úvod do problematiky

Mozkové gliomy jsou heterogenní skupinou primárních mozkových nádorů. Tvoří asi 40% všech mozkových nádorů. Roční incidence u dospělých dosahuje cca 5,4 nových případů na 100000 obyvatel (rok 2009). Incidence astrocytárních tumorů dosahuje 4,8 případů na 100000 obyvatel/rok, incidence oligodendrogliálních a ependymálních nádorů pouze 0,4 resp. 0,2. Nízkostupňové gliomy tvoří cca 20% z tohoto množství. Incidence gliomů u dětí dosahuje 2,5 nových případů na 100000 obyvatel, incidence low-grade gliomů je 0,6 na 100000 obyvatel/rok. U nízkostupňových gliomů se incidence ani ve světovém měřítku příliš neliší. U vysokostupňových gliomů se zdá, že je nižší v asijských zemích než v Evropě a Severní Americe ^(1, 2, 3).

Virchow v roce 1867 byl první, kdo předpokládal, že gliomy vyrůstají z intersticiální mozkové tkáně. Golgi v roce 1875 rozdělil gliomy na „tvrdé“ a „měkké“ formy na základě výskytu odlišného hvězdčovitého tvaru neurogliálních buněk. První, kdo užil termín glioblastoma multiforme, byli Harvey Cushing a Percival Bailey, kteří v roce 1926 publikovali jejich významnou práci „A Classification of Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis“ ⁽⁴⁾. Navrhovali opustit dosavadní nejednotnou terminologii (např. spongioblastome unipolare nebo spongioblastoma multipolare). Termín, který použili, lépe vystihoval podstatu tohoto typu gliomu: 1. vyrůstá z nejprimitivnějších prekursorů podpůrné mozkové tkáně (glioblasty), 2. morfologie nádoru je komplexní a vysoce variabilní (multiforme). Přestože současné poznatky vyvrátily jejich domněnku o původu nádoru v glioblastech, jejich histologické popisy a charakteristiky se příliš nezměnily. Z toho je patrné, že určení typu nádoru na základě histologického obrazu se opírá o práce až 90 let staré. Přesto musíme ocenit jejich pionýrskou práci, protože přinesli určitý řád do té doby velice nejednotné klasifikace a terminologie mozkových nádorů.

Současná úroveň znalostí se samozřejmě posunula dále, ale léčba mozkových gliomů nadále stagnuje.

Astrocytární nádory jsou v současné době nejvíce prostudovanou skupinou primárních nádorů mozku. Od roku 1985, kdy byla v glioblastomu (obr. 1 a 3) prokázána amplifikace *EGFR* genu ⁽⁵⁾, znalosti molekulárních mechanismů vzniku a průběhu gliomů značně pokročily. Dnes víme, že astrocytomy a oligodendrogliomy se liší svým vývojem zahrnujícím abnormality odlišných genů. Jednotlivým signálním cestám a významu jejich poruch u mozkových nádorů bylo věnováno review ^(6,7), nicméně vzhledem k důležitosti těchto cest v patogenezi gliomů věnujeme krátce prostor jejich stručnému popisu.

p53

Cesta p53 zahrnuje protein p53 a další proteiny, které se podílí na regulaci hladiny p53. Jedná se o transkripční faktor, který aktivuje velkou řadu genů různého účinku a funkce včetně genů pro apoptózu (BAX) a inhibitorů Rb1 cesty. Rovněž transkripce *MDM2* genu je ovlivňována p53, Mdm2 (a s ním i Mdm4) protein má negativní účinky na hladinu p53, ovlivňuje ubiquitylaci a degradaci p53 v proteazomu ⁽⁸⁾. p53 rovněž ovlivňuje Rb1 cestu pomocí účinku transkripčního faktoru E2F na fosforylaci Rb1, která indukuje transkripci *p14^{ARF}*. *p14^{ARF}* inhibuje degradaci p53 pomocí MDM2 ^(9,10). Zvýšená transkripce *p14^{ARF}* zvyšuje hladiny p53, což vede ke zvýšení senzitivity cesty p53, a tím k indukci zástavy buněčného cyklu a k buněčné apoptóze. Pokud je buňka významně poškozena, může být nasměrována s pomocí p53 do apoptózy ⁽¹¹⁾.

Rb1

Rb1 cesta je regulační systém kontrolující fosforylaci Rb1 a následné uvolnění E2F transkripčních faktorů. Tato cesta plní hlavní úlohu v přestupu z G₁ do S fáze buněčného

cyklu ^(12, 13, 14). Na podkladě mitogenních stimulů dochází ke zvýšené produkci cyklinů D (D1-D3) a tyto se váží na Cdk4 nebo Cdk6 (cyklin-dependentní kinázy), Komplex CDK4(CDK6)/cyklin D fosforyluje Rb1 protein s uvolněním E2F, což vede k aktivaci transkripce genů potřebných pro pokračování buněčného cyklu (zvl. cyklinu E). CDK4/cyklin D komplex je negativně regulován pomocí p16 (CDKN2A) a p15 (CDKN2B). Jakákoli odchylka v mechanismu kontrolujícím fosforylaci Rb1 proteinu či mutace *RBI* genu vede k neschopnosti rozštěpit E2F a tím k nedostačujícím hladinám E2F transkripčních faktorů. Navíc dochází ke zvýšené citlivosti cesty p53 zvýšenou transkripcí *p14^{ARF}* a zvyšuje se hladina p53 cestou inhibice *MDM2* aktivity ⁽¹⁵⁾.

Růstové faktory, receptory růstových faktorů, cesta PI3-kináza/Akt

Třetí cesta, která bývá příčinou vzniku astrocytárních nádorů je PI3-kináza/Akt. Cesta PI3-kináza/Akt se podílí na přenosu signálu cestou receptorů růstových faktorů. Ke zvýšené expresi EGFR či PDGF α receptoru dochází nejčastěji amplifikací příslušného genu ^(15, 16, 17). Po vazbě ligandu receptor dimerizuje a autofosforyluje intracelulární doménu, která pak navazuje adaptorové proteiny zavzaté v Ras/Raf/MAP kinázové cestě, a rovněž váže a aktivuje PI3-kinázu ^(15, 18, 19). Zhruba v polovině případů amplifikace *EGFR* dochází též k přestavbě amplifikovaného *EGFR* genu s expresí trvale aktivovaného proteinu, bez nutnosti vazby příslušného ligandu ^(20, 21). PI3-kináza následně lokálně fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-difosfát (PIP2) na fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP3). Hladina PIP3 je kontrolována pomocí Pten (fosfatázy kódované *PTEN* genem na 10q23-q24), která defosforyluje PIP3 zpět na PIP2 ^(18, 22). V případě absence proteinu Pten (delece či mutace obou alel *PTEN*) dochází k akumulaci PIP3. Prodloužení poločasu PIP3 vede k aktivaci Akt kinázové kaskády bez ohledu na nepřítomnost nadřazených stimulačních signálů. Mutace *PTEN* jsou detekovány ve více než 45% glioblastomů a předpokládá se jejich velký vliv na cestu Akt. Akt fosforyluje

mnoho dalších proteinů včetně proteinů, které jsou součástí apoptotické cesty, a tím se stávají mnohem rezistentnější vůči své aktivaci ^(22, 23).

Aktivace receptorů růstových faktorů autokrinní či parakrinní cestou či aktivační mutace ovlivňují PI3-kinázovou cestu, přičemž *PTEN* je zřejmě dalším bodem, kde dochází k přerušení této signální cesty.

Astrocytární nádory

Svým charakterem se z astrocytárních nádorů vymyká pilocytický astrocytom (WHO Grade I). Jedná se o benigní nádor s dobrou prognózou po radikálním odstranění nádoru. V posledních letech byla opakovaně potvrzena role genu *BRAF* v tumorigenezi tohoto nádoru ^(24,25). U difúzních astrocytomů (WHO grade II) (obr. 2 a 4) nacházíme především mutaci genu isocitrát dehydrogenázy 1 a 2 (*IDH1* a *IDH2*). Dále je u astrocytárních nádorů všech stupňů malignity nalézána mutace genu *TP53*. Gen *TP53* je mutován v 40-70% difúzních astrocytomů a anaplastických astrocytomů, ale pouze ve 30-40% glioblastomů ⁽²⁶⁾. U glioblastomů je vedle poruchy cesty p53 přítomná i porucha cest Rb1 a PI3-kináza/Akt. K amplifikaci *CDK4* dochází zhruba v 18% glioblastomů, amplifikaci *MDM2* nacházíme asi ve 14% případů glioblastomu ^(15, 27). Koamplifikace/overexprese těchto dvou genů vede k současnému přerušení obou cest, p53 i Rb1. Byla rovněž popsána amplifikace *MDM4*, homologu *MDM2* ⁽²⁸⁾, vyskytuje se v 7% glioblastomů.

CDKN2A/B a *p14^{ARF}* (kódují p16, p15 a p14^{ARF}) se nachází na stejném lokusu (9p21). Tento úsek chromosomu 9 bývá deletován v 50% glioblastomů a cca v 10% anaplastických astrocytomů ^(15, 29, 30). Nedávno byla popsána i možnost zapojení p18 do tumorigeneze glioblastomu, v některých nádorech byla popsána současná delece *CDKN2A* a *CDKN2C* ^(15, 31).

Mutace nebo homozygotní delece *RBI* genu (13q14) je nejčastěji nalézána u glioblastomu (11%) ^(15, 32). Hypermethylaci *RBI* promotoru, která blokuje transkripci genu,

nacházíme především v sekundárním glioblastomu, méně často u primárního, celkem asi v 25% glioblastomů ⁽³³⁾.

Amplifikace genu *EGFR* (7p11-p12) je detekována v cca 45% glioblastomů ^(15-18, 34, 35) a v části anaplastických astrocytomů. Zvýšená exprese může být u glioblastomu ale přítomna i bez amplifikace (cca 15%). Delece *TP53* je velmi úzce spjata se zvýšenou expresí *PDGFR-α*, což může znamenat, že mutace *TP53* má onkogenní efekt především ve spojení se zvýšenou expresí *PDGFR-α*. Z dalších růstových faktorů a receptorů se v onkogenezi astrocytomů zvýšenou expresí uplatňují: *ERBB2* (17q21.1), mutace bývá přítomna v cca 8% glioblastomů, dále *MET* (7q31), amplifikován ve 4% glioblastomů. Poměrně nedávno byl zjištěn i relativně častý výskyt homozygotní delece *NFI* genu (17q11.2), až u 18% glioblastomů, a dále mutace *PIK3CA* (3q26.3) u 15% glioblastomů ⁽¹⁵⁾.

Zmnožení části či celého chromosomu 7 je jednou z nejčastějších chromosomových odchylek astrocytárních nádorů. Byla pozorována až u 60% glioblastomů, a to s či bez amplifikace *EGFR* ⁽³⁶⁾. Delece chromosomu 10 je zdaleka nejčastější abnormalitou u glioblastomů. Deleci nalézáme u 70% glioblastomů, ve většině případů se jedná o monosomii celého chromosomu 10 ⁽¹⁵⁾. Méně často je přítomna i u anaplastických astrocytomů a difúzních astrocytomů.

Oligodendrogliální nádory

Oligodendrogliomy vychází z oligodendrocytů. Vyskytují se jednak ve formě oligodendrogliomu WHO Gr. II (obr. 5) nebo ve formě jeho malignější varianty – anaplastického oligodendrogliomu WHO Gr. III. Od astrocytárních nádorů se odlišují především svojí chemosenzitivitou a poněkud lepší prognózou.

U oligodendrogliálních nádorů je nejčastěji zjištěnou aberací vedle již dříve zmiňované mutace *IDH1/2* delece 1p a 19q ⁽²⁶⁾. Ve většině případů se tyto delece vyskytují

společně v rámci jednoho tumoru, mají zřejmě synergický účinek a postihují zpravidla celé rameno chromosomu. U oligodendrogliomů se vyskytuje kombinovaná LOH 1p/19q až v 80%. U anaplastických oligodendrogliomů pak dosahuje cca 60%. U oligoastrocytomů se LOH 1p/19q vyskytuje v 30-50%, u anaplastických oligoastrocytomů pak výskyt kombinované delecí dosahuje 20-30%. Oproti tomu u difuzních astrocytomů se vyskytuje v méně než 10% ^(26, 37-39). U oligoastrocytomu v obou složkách nacházíme stejné aberace, což svědčí pro monoklonální původ nádoru ⁽⁴⁰⁾. Schopnost diferenciací do astrocytárního či oligodendroglialního fenotypu je zřejmě ovlivněna podmínkami vnitřního prostředí.

Vedle již zmíněných změn můžeme v oligodendrogliomech a oligoastrocytomech nalézt v menší míře i mutace *TP53*, delecí *CDKN2A*, LOH 4q, 4p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17p a 18q. Na rozdíl od astrocytomů je nález LOH 17p a mutace *TP53* sporadický a v kombinaci s LOH 1p vzácný, dosahuje cca 7% ^(26, 41, 42). U anaplastických oligodendrogliomů se ale ve zvýšené míře vyskytují abnormality obdobné jako u astrocytomů. Nacházíme delecí 9p, delecí *CDKN2A/B* a *p14^{ARF}* (9p21), delecí 10q, mutaci *PTEN* (10q23), amplifikaci či zvýšenou expresí *EGFR* (7p12), mutaci nebo delecí *CDKN2C* či *RBI* ⁽⁴²⁾.

2. Hypotéza a cíle práce

Téma práce vychází z předpokladu, že chromosomové změny, které nacházíme v mozkových gliomech, jsou nenáhodné. Je tedy pravděpodobné, že aberace, které jsou nalézány ve vyšším procentu, mohou být patogenetickým podkladem vzniku těchto nádorů. Cílem práce bylo určit aberace, které se v gliomech nachází, jako kandidáty pro další vyšetření. Dalším cílem bylo zvolení vhodné metodiky odběru a zpracování tkáňového vzorku a jeho příprava k FISH. Hlavním cílem bylo provedení fluorescenční *in-situ* hybridizace pomocí centromerických a lokus specifických sond na interfázních jádrech buněk mozkových gliomů k detekci určených chromosomových aberací, vyhodnocení a statistické zpracování výsledků I-FISH, korelace s klinickými a morfologickými vyšetřeními a formulace závěrů včetně publikační aktivity.

3. Materiál a metodika

Do prospektivní studie byli zařazeni pacienti s předpokládaným gliálním nádorem mozku, kteří podepsali informovaný souhlas s genetickým vyšetřením. Informovaný souhlas byl schválen Etickou komisí ÚVN.

Během neurochirurgického výkonu byly odebírány tkáňové vzorky u pacientů s mozkovým gliomem. Kontrolní vzorky byly odebírány od pacientů s epilepsií při epileptochirurgickém výkonu. Čerstvě odebraný vzorek byl ihned zpracován – byla provedena resuspendace v médiu (PBS, heparin), následně pak byl materiál zpracován pomocí standardní cytogenetické techniky (hypotonie, fixace vzorku). Vlastní FISH analýza byla provedena vždy až následně po provedení imunohistochemické analýzy, aby bylo ověřeno, že se jedná o gliální nádor. Pro FISH analýzu byly použity dvoubarevné lokus-specifické a/nebo centromerické Vysis sondy (Abbott–Molecular) dle doporučení výrobce (viz Tab.1.). K vyšetření byly vybrány sondy k detekci delece *TP53*, *RB1* a *CDKN2A*, amplifikace *EGFR*, trisomie chromosomu 7 a monosomie chromosomu 10. U oligodendrogliálních nádorů byly vzorky rovněž analyzovány na přítomnost delece 1p36 a 19q13.3.

Tab. 1. Použité sondy

Chromosomové aberace	DNA sonda	Značení	Výrobce
delece <i>TP53</i>	LSI® <i>p53</i> (17p13.1) / CEP® 17	SO / SG	Abbott Molecular
delece <i>CDKN2A</i>	LSI® <i>p16</i> (9p21) / CEP® 9		
delece <i>RB1</i>	LSI® <i>RB1</i> (13q14) / LSI® 13qter		
delece 1p36	LSI® 1p36 / LSI® 1q25		
delece 19q13.3	LSI® 19q13/ LSI® 19p13		
amplifikace <i>EGFR</i> / trisomie 7	LSI® <i>EGFR</i> / CEP® 7		
monosomie 10	CEP® 10 / control CEP® probe		

Buňky byly obarveny pomocí DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole). Preparáty byly odečítány pomocí fluorescenčního motorizovaného mikroskopu Axioplan II (Zeiss) s příslušnými optickými filtry. V analýze bylo vždy hodnoceno nejméně 200 interfázních jader a byl hodnocen poměr fluorescenčního signálu příslušné specifické sondy a sondy kontrolní. Hranice positivity byla určena hodnotou 2 směrodatných odchylek (2SD), což zaručilo diagnostickou specifitu 97,5% pro amplifikace a 95% pro delece. Obraz byl zaznamenán a zpracován pomocí ISIS software (MetaSystems).

Získaná data byla zpracována pomocí statistického programu XLSTAT 2012, verze 2012.3.01. Všechna data byla zpracována k datu 31.3.2012. Celkové přežití bylo stanoveno pomocí Kaplan-Meierovy analýzy. Rozdíly v křivkách funkce přežití byly testovány pomocí log-rank testu, Wilcoxonova a Tarone-Ware testu k určení statistické významnosti. Nezávislé prognostické faktory byly identifikovány pomocí vícenásobné regresní metody Coxova regresního modelu a logistické regresní analýzy. Za efektivní prediktor sledovaného jevu byla považována signifikance (p-value) menší než 0,05.

4. Výsledky

Od března 2004 do dubna 2010 bylo odebráno celkem 270 vzorků u pacientů s mozkovým gliomem během neurochirurgického výkonu. Vlastní soubor pacientů byl tvořen 111 ženami a 159 muži. Věkový průměr souboru při stanovení diagnózy byl 50 let, při vlastní operaci 51,4 roku. Nejčastějším iniciálním příznakem mozkového gliomu byl epileptický záchvat (114 pacientů), dále ložiskový neurologický deficit (65 pacientů), relativně často byla prvním příznakem cefalea (40 pacientů), organický psychosyndrom (25 nemocných), dále syndrom nitrolební hypertenze (10 pacientů) a porucha paměti (9 pacientů). Nespecifické obtíže vedly k vyšetření u 6 nemocných a v 1 případě se jednalo o asymptomatický nález na CT vyšetření mozku, které bylo provedeno z jiného důvodu. Z celkového počtu 270 vzorků bylo možné provést molekulárně-cytogenetickou analýzu pomocí fluoresceční *in-situ* hybridizace u 264 vzorků (98% všech analyzovaných vzorků). Pouze v 6 případech nebylo možné FISH analýzu provést pro nedostatek materiálu. Z 264 vzorků koreloval klinický průběh s histologií a FISH ve 225 případech (85% všech vzorků), ve 39 případech shoda nenastala.

Iniciální příznak	Počet pacientů
Epileptický záchvat	114
Ložiskový nález	65
Cefalea	40
Organický psychosyndrom	25
Syndrom nitroleb. hypertenze	10
Porucha paměti	9
Jiné	6
Asymptomatický	1

Tab. 2. Iniciální příznak onemocnění

Soubor byl pro další hodnocení rozdělen na jednotlivé skupiny diagnóz podle histopatologických kritérií.

Typ nádoru	WHO grade	Počet pacientů	FISH vyš.
Pilocytický astrocytom	I	7	6
Difuzní astrocytom	II	38	37
Anaplastický astrocytom	III	28	27
Glioblastom	IV	145	144
Oligodendrogliom	II	18	18
Anaplastický oligodendrogliom	III	27	26
Anaplastický oligoastrocytom	III	7	6

Tab. 3. Jednotlivé typy nádorů v souboru dle histologických diagnóz, počtu pacientů a provedených I-FISH

Pilocytický astrocytom WHO Grade I

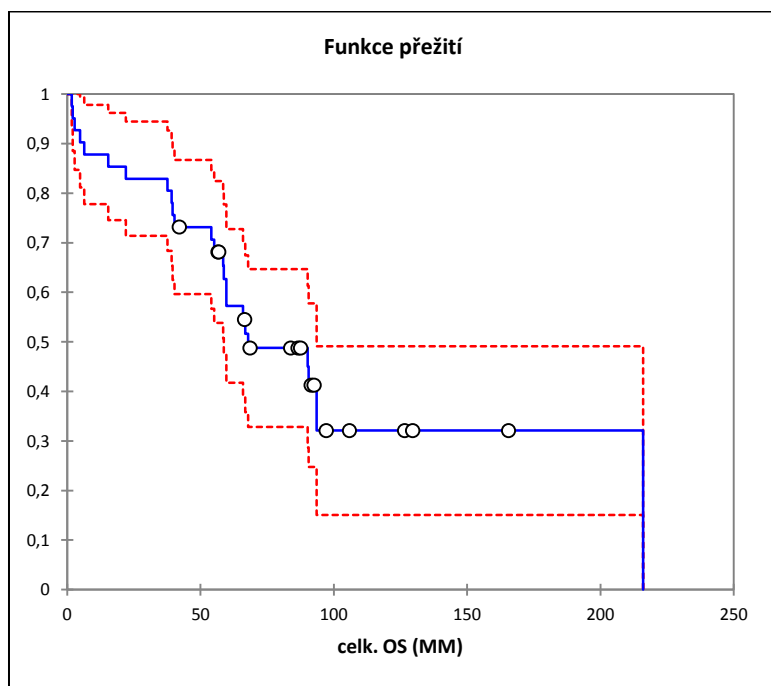
Ve skupině pacientů s pilocytickým astrocytmem, Gr. I, bylo 7 nemocných (zdrojová data v příloze Tab. 24). Jedná se o mladé pacienty (průměrný věk při stanovení diagnózy byl 24,7 let). Všichni pacienti přežívají (1 pacient sledován s progresí, 1 pacientka pro progresi podstoupila 2. resekci), nebylo dosaženo mediánu přežití, současná doba sledování dosáhla průměrně 76,9 měsíců (45,2 – 109,5 měsíců), medián sledování je 73,4 měsíců, průměrná doba sledování od operace je 66,8 měsíců, medián sledování od operace je 44,5 měsíců. Průměrné Karnofsky skóre před operací dosáhlo 93.

Pomocí FISH analýzy byla ve 3 případech nalezena polyploidie, v jednom případě současně s polyploidíí byla nalezena monosomie chromosomu 10. U této pacientky byla pozorována rychlá grafická progrese reziduálního nádoru, byla zpochybněna původní histologie a uvažováno o gliomu vyššího grade. Při reoperaci byl odebrán nový vzorek, který byl hodnocen jako difuzní astrocytom. Pacientka nakonec podstoupila radioterapii. FISH analýza korelovala s klinickým obrazem, histologickým vyšetřením a průběhem onemocnění v 5 případech. V jednom případě FISH výsledek oproti histologickému vyšetření avizoval horší prognózu, která byla posléze při dalším sledování potvrzena.

Závěr: Nález jiné aberace než polyploidie budí podezření na špatně stanovenou histologickou diagnózu, tyto pacienty je nutné sledovat a kontrolovat častěji

Difúzní astrocytom WHO Grade II

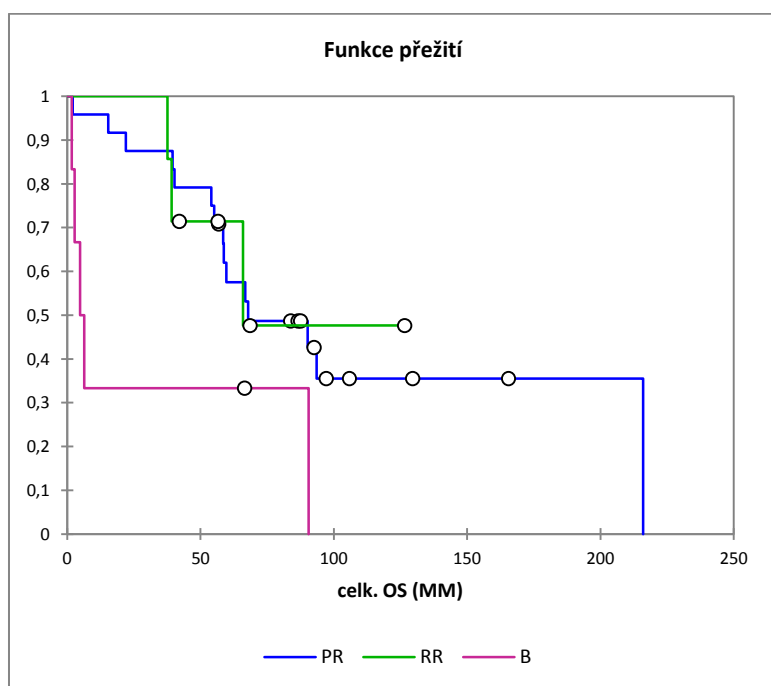
Do skupiny pacientů s difúzním (35 nemocných) a gemistocytárním astrocytomem (3 pacienti), Gr. II, bylo zařazeno celkem 38 pacientů (zdrojová data Tab. 25). Z tohoto počtu 23 nemocných již v průběhu sledování zemřelo, medián přežití dosáhl 67,8 měsíců, medián přežití od operace pak 59,5 měsíců, průměrná doba přežití dosahuje 104,7 měsíců (74,9 – 134,4 měsíců v intervalu +/- 95%), průměrná doba přežití od operace 52 měsíců (40,1 – 63,8 měsíců). I v tomto případě se jedná o mladší pacienty (průměrný věk při stanovení diagnózy dosáhl 37,4 let).



Graf 1. Křivka funkce přežití u pacientů s difúzním astrocytomem Grade II, cenzorovaná událost

○

Průměrné Karnofsky skóre (KPS) před operací bylo 91. Soubor byl hodnocen i z hlediska radikality resekce, bylo prokázáno, že medián přežití pacientů s biopsií dosahuje pouze 6,3 měsíců. Oproti tomu pacienti, kteří podstoupili parciální resekci, dosáhli mediánu přežití 67,8 měsíců, pacienti po radikální resekci (myšleno ve smyslu MRI radikální resekce) dosáhli mediánu 65,9 měsíců.



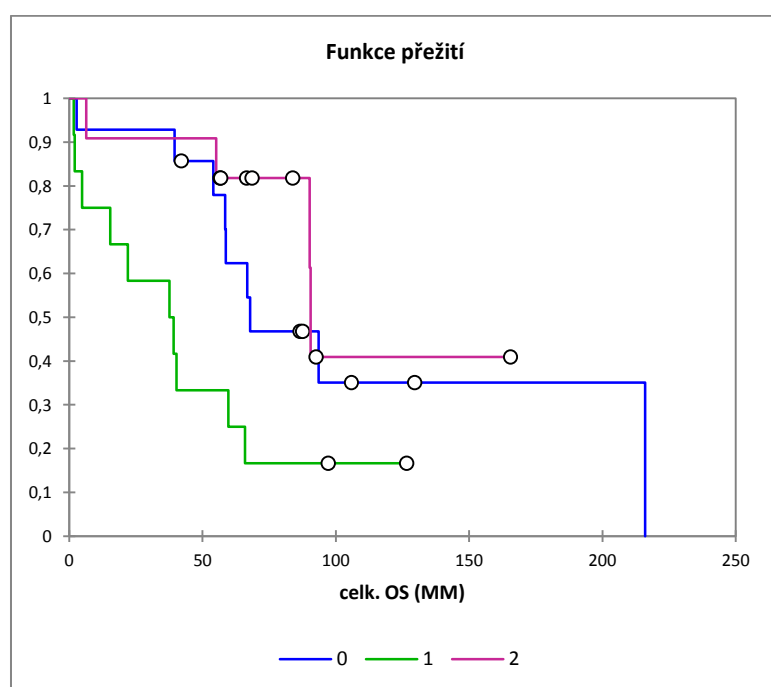
Graf 2. Srovnání křivek funkce přežití u pacientů s difuzním astrocytomech v závislosti na radikálnosti resekce (RR – radikální resekce, PR – parciální resekce, B – biopsie)

Test	Observed value	Critical value	p-value	Alpha
Log-rank	5,173	5,991	0,075	0,050
Wilcoxon	7,200	5,991	0,027	0,050
Tarone-Ware	6,131	5,991	0,047	0,050

Tab. 4. Porovnání funkcí přežití (DF = 2)

Difuzní astrocytomy byly zastoupeny v 37 vzorcích. Nejčastějším nálezem byla polyploidie, byla nalezena ve 23 případech. Ve 13 vzorcích nebyla nalezena žádná aberace. Ostatní nálezy byly vzácnější: monosomie chromosomu 10 byla detekována 4x, amplifikace

EGFR 2x, trisomie chromosomu 7 1x, delece *RBI* 3x (obr. 6), delece *CDKN2A* 2x (obr. 7). Monosomie chromosomu 13 a 17 shodně pouze 1x. Tyto chromosomové aberace byly souhrnně označeny jako jiné aberace. Při provedení Kaplan-Meierovy analýzy s rozdělením skupiny na vzorky s polyploidií (0), vzorky s jinou aberací (1) a vzorky s negativním nálezem (2) vyplynulo, že ve skupině 0 bylo dosaženo mediánu přežití 67,8 měsíce (14 pacientů), ve skupině 1 (vzorky s jinou aberací) dosáhl medián přežití pouze 37,5 měsíce (12 pacientů), ve skupině 2 dosáhl medián přežití 90,5 měsíce (11 pacientů), tyto rozdíly jsou statisticky signifikantní.



Graf 3. Srovnání křivek funkce přežití u pacientů s difuzním astrocytome Grade II (0 – pouze polyploidie, 1 – přítomna jiná aberace, 2 – bez nálezu aberace) včetně statistického porovnání jednotlivých křivek přežití, ○ cenzorovaná událost

Test	Observed value	Critical value	p-value	alpha
Log-rank	7,414	5,991	0,025	0,050
Wilcoxon	10,866	5,991	0,004	0,050
Tarone-Ware	9,743	5,991	0,008	0,050

Tab. 5. Porovnání funkcí přežití (DF = 2)

Analýza dat prokázala, že jako statisticky významný rizikový faktor se jeví přítomnost jiné aberace (negativní nález nebo polyploidie nejsou statisticky významné faktory). Při vytvoření Coxova regresního modelu se započtením věku a Karnofsky skóre před operací tento rizikový faktor přetrvává, funkce hazardu dosahuje 3,95. Další rizikové faktory jsou věk (funkce hazardu 1,05) a Karnofsky skóre před výkonem (0,95).

Regresní koeficienty:

Variable	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Hazard ratio	Hazard ratio Lower bound (95%)	Hazard ratio Upper bound (95%)
věk při dg.	0,045	0,020	5,114	0,024	1,046	1,006	1,087
KPS	-0,056	0,023	5,985	0,014	0,946	0,905	0,989
poly/jiná-1	1,375	0,533	6,657	0,010	3,954	1,392	11,236
poly/jiná-2	-0,409	0,643	0,403	0,525	0,665	0,188	2,345

Tab. 6. Coxův model přežití u difuzního astrocytomu Grade II v závislosti na KPS, věku a přítomné aberaci (Poly/jiná-1 – přítomna jiná aberace, Poly/jiná-2 – bez nálezu aberace)

Pokud jsme do tohoto modelu zařadili i radikalitu resekce, pak jediným statisticky významným faktorem ovlivňujícím celkové přežití zůstala přítomnost jiné aberace! Pokud byla jiná aberace ve vzorku nalezena, riziko úmrtí bylo 3,8x vyšší.

Regresní koeficienty:

Variable	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Hazard ratio	Hazard ratio Lower bound (95%)	Hazard ratio Upper bound (95%)
věk při dg.	0,032	0,021	2,247	0,134	1,033	0,990	1,077
KPS	-0,045	0,024	3,529	0,060	0,956	0,912	1,002
poly/jiná-1	1,334	0,589	5,131	0,024	3,796	1,197	12,038
poly/jiná-2	-0,882	0,765	1,329	0,249	0,414	0,093	1,854
resekce-RR	-0,395	0,728	0,293	0,588	0,674	0,162	2,810
resekce-B	1,438	0,814	3,123	0,077	4,212	0,855	20,750

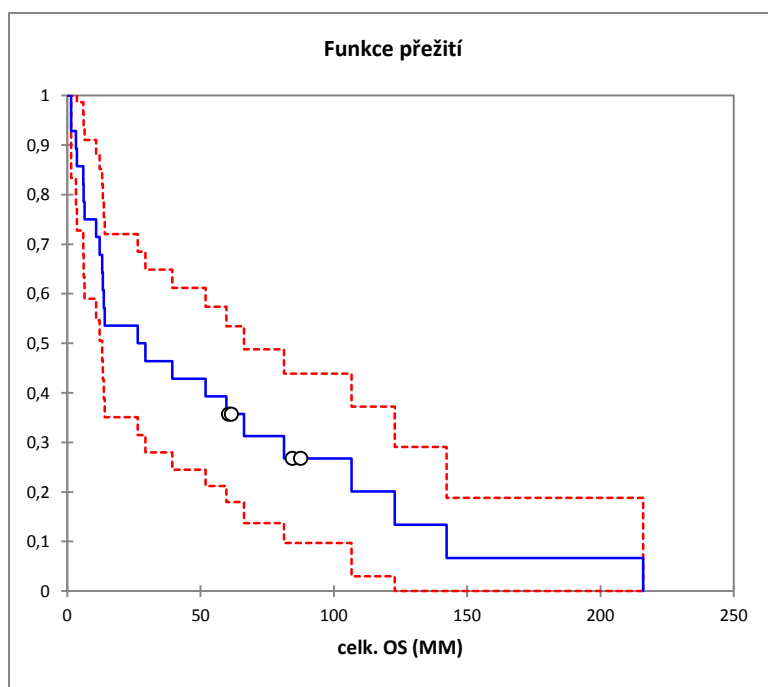
Tab. 7. Coxův model přežití u difuzního astrocytomu Grade II v závislosti na KPS, věku, přítomné aberaci a radikalitě resekce (Poly/jiná-1 – přítomna jiná aberace, Poly/jiná-2 – bez nálezu aberace, resekce-RR – radikální resekce, resekce-B - biopsie)

Korelace FISH analýzy, klinického průběhu a histologického vyšetření byla dosažena v 31 případech, ve čtyřech případech analýza neprokázala přítomnost chromosomové aberace, s čímž kontrastoval klinický průběh s kratším celkovým přežitím pacientů. Ve dvou případech byl naopak FISH nález spojen s horší prognózou pacienta (nález jiné aberace v kontrastu s delší dobou přežití).

Závěr: Nález jiné aberace významně zhoršuje prognózu pacientů, dochází k rychlejšímu upgradingu a progresi nádoru, riziko úmrtí stoupá 3,8x. Negativní FISH nález je pozitivní prognostický ukazatel.

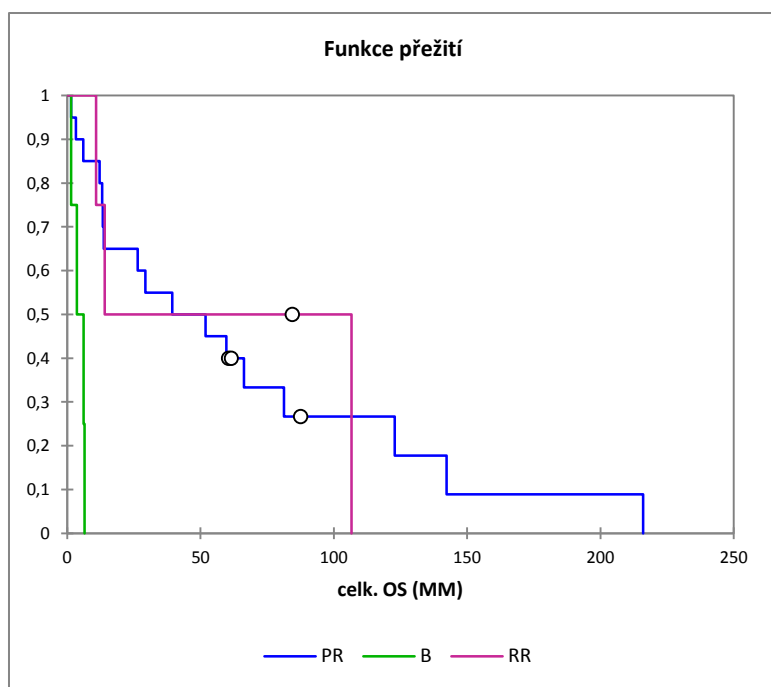
Anaplastický astrocytom WHO Grade III

Skupinu pacientů s anaplastickým astrocytmem, Gr. III, tvořilo 28 nemocných, v současné době přežívají 4 pacienti (zdrojová data Tab. 26). Medián přežití v této skupině dosáhl 29,3 měsíců, medián přežití od operace 12,9 měsíců, průměrná doba přežití je 57,1 měsíců (32,1 – 82,1 měsíců), průměrná doba přežití od operace 22 měsíců (14,6 – 29,3 měsíců), medián sledování dosáhl 26 měsíců, medián sledování od operace 12,6 měsíců.. Průměrný věk pacientů v této skupině k datu stanovení diagnózy byl 46,9 let. Průměrné Karnofsky skóre pacientů před operací bylo 85.



Graf 4. Křivka funkce přežití u pacientů s anaplastickým astrocytmem Grade III, ○ cenzorovaná událost

Korelace radikality resekce a celkového přežití prokázala nejdelší přežití u pacientů po radikální resekci, medián přežití byl 106 měsíců, u biopsií dosáhl pouze 6 měsíců. Ve skupině pacientů s parciální resekci byl medián přežití 39 měsíců, výsledek je částečně limitován velikostí souboru, ale statisticky významný.



Graf 5. Kaplan-Meierova analýza přežití v závislosti na radikalitě resekce (RR – radikální resekce, PR- parciální resekce, B – biopsie), ○ cenzorovaná událost

Test	Observed value	Critical value	p-value	Alpha
Log-rank	14,981	5,991	0,001	0,050
Wilcoxon	13,163	5,991	0,001	0,050
Tarone-Ware	14,098	5,991	0,001	0,050

Tab. 8. Porovnání funkcí přežití (DF = 2)

V této skupině bylo analyzováno 27 vzorků. Podobně jako u difuzních astrocytomů byla nejčastějším nálezem polyploidie, celkem v 15 vzorcích. V 10 případech byla nalezena delece *CDKN2A*, ve 4 případech delece *RBI* (z toho pouze v jednom případě byly obě delece nalezeny současně). Monosomie chromosomu 9 byla zjištěna v jednom případě, společně s (bialelickou) delecí *CDKN2A*. Trisomie chromosomu 7 byla zjištěna v 5 případech, amplifikace *EGFR* pouze 1x. Monosomie chromosomu 10 byla detekována 2x. Monosomie chromosomu 17 byla nalezena 1x. Ve dvou případech nebyla žádná aberace ve vzorku nalezena.

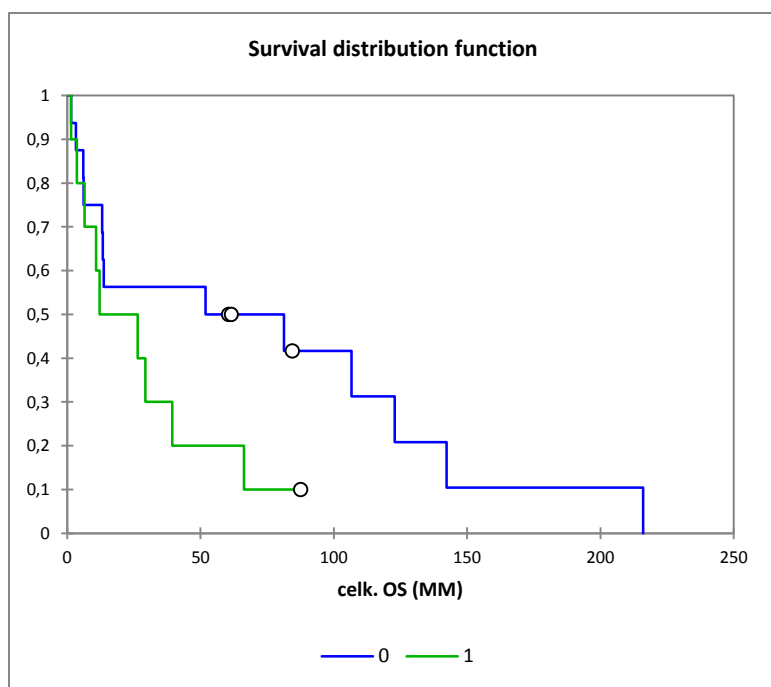
Coxův regresní model pracoval se třemi skupinami parametrů, byla hodnocena přítomnost polyploidie, dále delece *CDKN2A* a nakonec přítomnost jiných aberací (viz výše). Přítomnost jiné aberace než delece *CDKN2A* nebo polyploidie v našem souboru pacientů s anaplastickým astrocytomech zvyšuje riziko úmrtí 2x, ale pod hranici významnosti.

Regresní koeficienty:

Variable	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Hazard ratio	Hazard ratio Lower bound (95%)	Hazard ratio Upper bound (95%)
poly-0	-0,270	0,493	0,299	0,584	0,764	0,290	2,008
delece(p16)-1	0,233	0,489	0,227	0,634	1,262	0,484	3,289
jiné-1	0,752	0,485	2,407	0,121	2,122	0,820	5,491

Tab. 9. Coxův model přežití u anaplastického astrocytomu Grade III v závislosti na přítomné aberaci (pouze polyploidie, delece *CDKN2A*, jiné aberace, 1 – aberace nalezena, 0 – aberace nezjištěna)

Kaplan-Meierova analýza obou skupin (bez nebo s jinou aberací) prokázala významný rozdíl: ve skupině 1 (jiné aberace) dosáhl medián přežití pouze 26,4 měsíců, průměrná doba přežití 26,2 měsíců, ve skupině 0 (bez jiných aberací) pak medián přežití byl 81,3 měsíců, průměrná doba přežití byla 74,80 měsíců. Přestože rozdíl v přežití je značný a trend patrný, křivky přežití se statisticky významně neliší.



Graf 6. Srovnání křivek funkce přežití u pacientů s anaplastickým astrocytmem Grade III (0 – jiné aberace ne, 1 – jiné aberace ano); ○ cenzorovaná událost

Test	Observed value	Critical value	p-value	alpha
Log-rank	2,660	3,841	0,103	0,050
Wilcoxon	1,573	3,841	0,210	0,050
Tarone-Ware	2,081	3,841	0,149	0,050

Tab. 10. Porovnání funkcí přežití (DF = 1)

Pokud do Coxova modelu zahrneme i věk při stanovení diagnózy a Karnofsky skóre před operací, pak jsou přítomné aberace rovněž pod hranicí významnosti a neovlivňují celkovou dobu přežití. I v tomto modelu je ale přítomnost jiných aberací (kromě polyploidie a delece *CDKN2A*) nejvýznamnějším ukazatelem po věku pacientka a KPS.

Regressní koeficienty:

Variable	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Hazard ratio	Hazard ratio Lower bound (95%)	Hazard ratio Upper bound (95%)
KPS	-0,152	0,048	10,163	0,001	0,859	0,782	0,943
věk při dg.	0,077	0,024	10,562	0,001	1,080	1,031	1,132
poly-0	-0,370	0,635	0,340	0,560	0,691	0,199	2,399
delece(p16)-1	-0,096	0,622	0,024	0,878	0,909	0,269	3,076
jiné-1	0,626	0,513	1,486	0,223	1,870	0,684	5,115

Tab. 11. Coxův regresní model přežití u anaplastického astrocytomy v závislosti na věku, KPS a přítomných aberacích (1 – aberace nalezena, 0 – aberace nezjištěna)

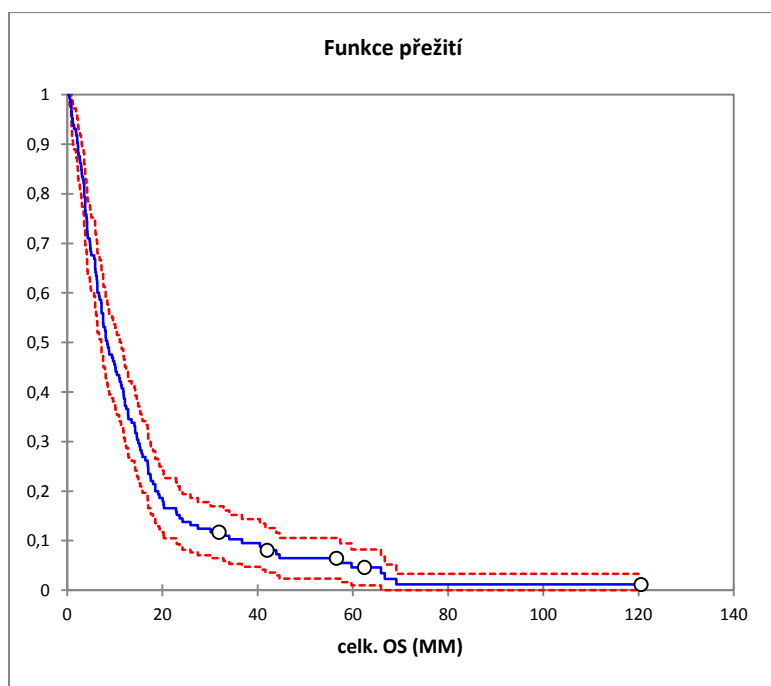
Korelace histologické diagnózy, klinického obrazu a molekulárně-cytogenetické analýzy bylo dosaženo v 21 případech, u 6 pacientů nekoreloval klinický průběh s výsledkem FISH, pacienti přežívali výrazně kratší dobu (OS 1,5 – 6,1 měsíců), Z těchto 6 případů ve dvou případech FISH nález odpovídal spíše glioblastomu a tedy predikoval horší prognózu pacientů (amplifikace *EGFR*, trisomie 7, monosomie 10). Ve zbylých 4 případech byl výsledek FISH neinformativní (ve 2 případech byl výsledek FISH analýzy negativní, u dvou pacientů byla nalezena pouze polyploidie).

Závěr: Nález jiné aberace kromě delece *CDKN2A* svědčí pro horší prognózu pacientů s anaplastickým astrocytomy, tyto pacienti dosahují kratší doby přežití.

Multiformní glioblastom WHO Grade IV

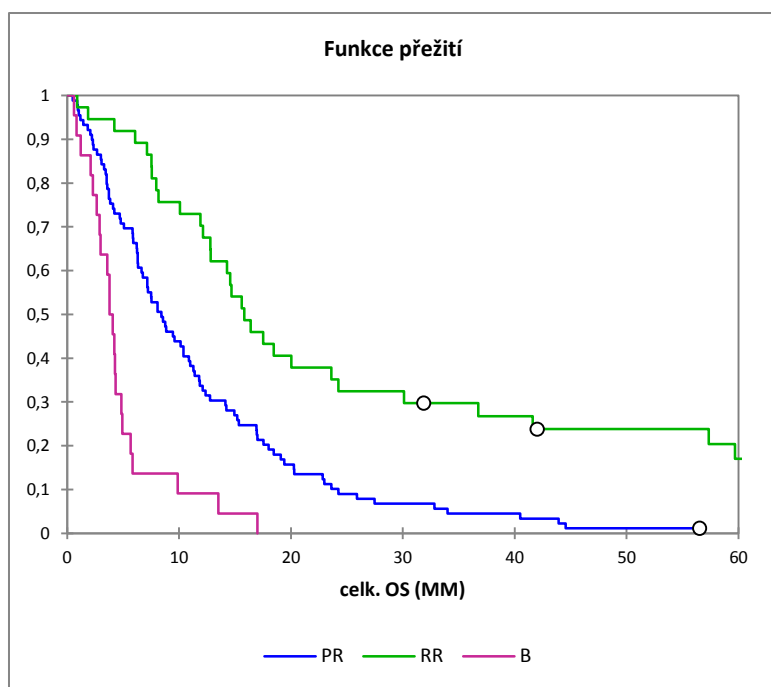
Medián přežití u skupiny pacientů s glioblastomy, Gr. IV, dosáhl pouze 8,4 měsíců, medián přežití od operace pak 6,5 měsíců, průměrná doba přežití je 14,3 měsíců (11,7 – 17 měsíců), od výkonu pak 11,1 měsíců (8,9 – 13,3 měsíců). Z celé skupiny 145 pacientů v současné době přežívá pouze 5 pacientů, čtyři jsou mladší 40 let, 1 pacient dosáhl 50 let věku (zdrojová data Tab. 27). Nejkratší OS od operace v této skupině doposud přežívajících pacientů dosáhl 31,2 měsíců, nejdelší pak 59,2 měsíců (tato pacientka se sekundárním

glioblastomem přežívá již 120,5 měsíce od stanovení diagnózy mozkového gliomu). Medián celkového sledování dosáhl 8,2 měsíců, medián sledování od operace byl 6,5 měsíců. Průměrný věk nemocných ve skupině pacientů s glioblastomem k datu stanovení diagnózy byl 58,7 let. Průměrné Karnofsky skóre před výkonem bylo 83.



Graf 7. Křivka funkce přežití skupiny pacientů s glioblastomem, ○ cenzorovaná událost

Nejprve byla provedena analýza celkového přežití v závislosti na typu výkonu, nejkratší medián přežití byl zaznamenán u biopsií – 4 měsíce, ve skupině parciálních resekcí dosáhl medián přežití 8,4 měsíců. Nejlepších výsledků bylo dosaženo ve skupině radikálních resekcí, zde medián přežití dosáhl 15,8 měsíců. Tento výsledek je statisticky vysoce signifikantní.



Graf 8. Srovnání křivek funkce přežití u pacientů s glioblastomem (PR – parciální resekce, RR – radikální resekce, B – biopsie), ○ cenzorovaná událost

Test	Observed value	Critical value	p-value	alpha
Log-rank	46,837	5,991	< 0,0001	0,050
Wilcoxon	40,408	5,991	< 0,0001	0,050
Tarone-Ware	43,949	5,991	< 0,0001	0,050

Tab. 12. Porovnání funkcí přežití (DF = 2)

Skupina pacientů s glioblastomem tvořila více než polovinu souboru, celkem 145 pacientů. U pacientů s GBM byla nejčastěji nalezena monosomie chromosomu 10, celkem u 99 nemocných (68%) (obr. 8). Dalším častým nálezem je amplifikace *EGFR* (obr. 9), nalezena byla v našem souboru pacientů s GBM u 62 z nich (43% případů glioblastomu). V 53 případech byla zjištěna trisomie chromosomu 7 (37%). Pouze v 10 případech byla nalezena jak amplifikace *EGFR* tak trisomie 7 (6,8% vzorků GBM). Polyploidie byla nalezena u 70 nemocných s glioblastomem (47%). Delece *CDKN2A* byla detekována ve 40 případech (28%), z toho ve 33 případech se jednalo o bialelickou delecí (v 80% těchto delecí). U 25 nemocných byla nalezena jak amplifikace *EGFR* tak delece *CDKN2A*. Ostatní nálezy

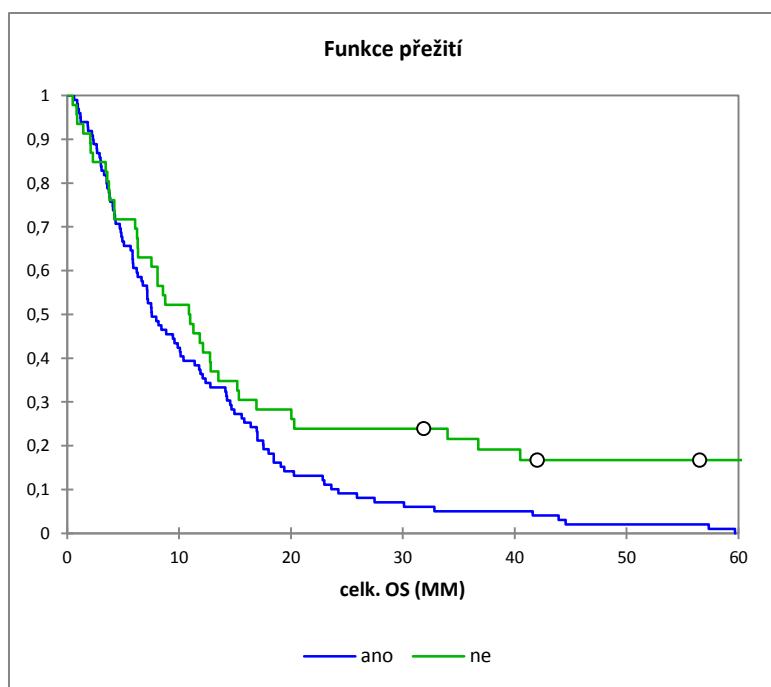
byly zjištěny pouze v malém procentu: delece *RB1* v 7 případech, monosomie chromosomu 9 ve 4 případech (2x současně s delecí *CDKN2A*), monosomie chromosomu 17 v 6 případech, monosomie chromosomu 13 9x, delece *TP53* 4x. Bylo provedeno několik Kaplan-Meierových analýz se zaměřením na přítomnost nejčastějších aberací u glioblastomu. Nejprve byl vytvořen Coxův regresní model přežití v závislosti na nejčastějších chromosomových aberacích nalézáných v glioblastomu (amplifikace *EGFR*, monosomie chromosomu 10, trisomie chromosomu 7 a polyploidie). Jako nejvýznamnější aberace se v našem souboru pacientů s glioblastomem jevila monosomie chromosomu 10, při její nepřítomnosti klesá riziko úmrtí (funkce hazardu 0,58), nepřítomnost polyploidie naopak prognózu mírně zhoršuje (funkce hazardu 1,51).

Regresní koeficienty:

Variable	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Hazard ratio	Hazard ratio Lower bound (95%)	Hazard ratio Upper bound (95%)
polyploidie-ne	0,409	0,190	4,636	0,031	1,505	1,037	2,183
monosomie 10-ne	-0,548	0,215	6,498	0,011	0,578	0,380	0,881
amp. <i>EGFR</i> -ne	0,363	0,202	3,215	0,073	1,437	0,967	2,137
trisomie 7-ano	-0,295	0,199	2,194	0,139	0,744	0,504	1,100

Tab. 13. Coxův regresní model přežití v závislosti na přítomnosti trisomie 7, monosomie 10, amplifikace *EGFR* a polyploidie

Kaplan-Meierova analýza pacientů bez a s monosomií chromosomu 10 prokázala signifikantní rozdíl v přežití, ve skupině bez přítomnosti této aberace dosáhl medián přežití 11 měsíců (7,5 – 13,5 měsíců), pokud byla monosomie ve vzorku nalezena, medián přežití se snížil na 8,2 měsíců (6,2 – 10,4 měsíců).

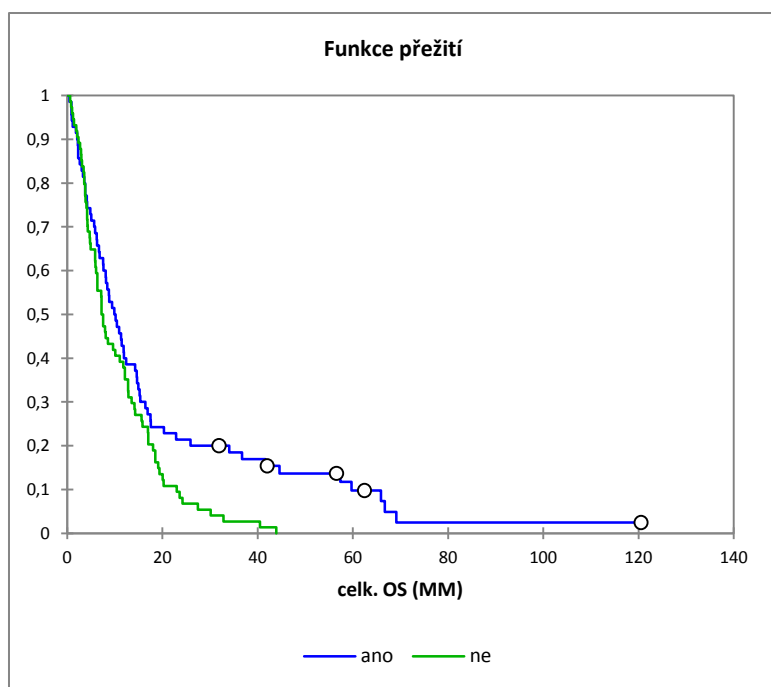


Graf. 9. Srovnání křivek funkce přežití u pacientů s glioblastomem v závislosti na přítomnosti monosomie chromosomu 10, ○ cenzorovaná událost

Test	Observed value	Critical value	p-value	Alpha
Log-rank	6,442	3,841	0,011	0,050
Wilcoxon	1,630	3,841	0,202	0,050
Tarone-Ware	3,082	3,841	0,079	0,050

Tab. 14. Porovnání funkcí přežití (DF = 1)

Srovnání křivek odhadu přežití bylo rovněž analyzováno v závislosti na přítomnosti polyploidie. Medián přežití u pacientů bez polyploidie byl pouze 7,5 měsíců, zatímco ve skupině s přítomností polyploidie přesáhl 10,1 měsíců.



Graf 10. Srovnání křivek funkce přežití u pacientů s glioblastomem v závislosti na přítomnosti polyploidie, ○ cenzorovaná událost

Test	Observed value	Critical value	p-value	Alpha
Log-rank	5,597	3,841	0,018	0,050
Wilcoxon	1,530	3,841	0,216	0,050
Tarone-Ware	2,804	3,841	0,094	0,050

Tab. 15. Porovnání funkcí přežití (DF = 1)

Dále byla celá skupina analyzována dle nálezů amplifikace *EGFR*, trisomie chromosomu 7, delece *CDKN2A* nebo jiné aberace. V žádné z těchto skupin srovnání křivek přežití nedosáhlo statistické významnosti. Pokud byl do hodnocení zavzat i věk při stanovení diagnózy a Karnofsky skóre před operací, pak nejvýznamnějšími ukazateli přežití byl věk a Karnofsky skóre, ale statisticky významným faktorem zůstala polyploidie. Pokud nebyla ve vzorku nalezena, funkce hazardu dosáhla hodnoty 1,48 i přes vliv ostatních faktorů, ostatní parametry (monosomie 10, trisomie 7, amplifikace *EGFR*) již statisticky významné nebyly.

Regresní koeficienty:

Variable	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Hazard ratio	Hazard ratio Lower bound (95%)	Hazard ratio Upper bound (95%)
věk při dg.	0,058	0,010	37,042	< 0,0001	1,060	1,040	1,080
KPS před	-0,027	0,008	11,682	0,001	0,973	0,958	0,989
polyploidie-ne	0,389	0,184	4,443	0,035	1,475	1,028	2,117
monosomie 10-ne	-0,239	0,209	1,307	0,253	0,787	0,522	1,186
amp <i>EGFR</i> -ne	0,264	0,200	1,742	0,187	1,302	0,880	1,928
trisomie 7-ano	-0,120	0,204	0,349	0,555	0,887	0,595	1,322

Tab. 16. Coxův regresní model celkové přežití v závislosti na věku, Karnofsky skóre a nalezených aberacích

Pomocí logistické regresní analýzy jsme vyjádřili vztah mezi monosomií chromosomu 10 a věkem: na základě dat našeho souboru byla stanovena závislost výskytu monosomie chromosomu 10 na věku (poměr šancí 1,04), tento výsledek byl statisticky signifikantní. Se stoupajícím věkem stoupá výskyt monosomie chromosomu 10.

Effect	monosomie 10 – poměr šancí (GBM data) Distribution : BINOMIAL, Link function: LOGIT Modeled probability that monosomie 10 = 1			
	Odds Ratio	Lower CL 95%	Upper CL 95%	P
Intercept	0.168818	0.026734	1.066022	0.058495
Věk	1.045035	1.012423	1.078697	0.006465
Scale	1.000000			

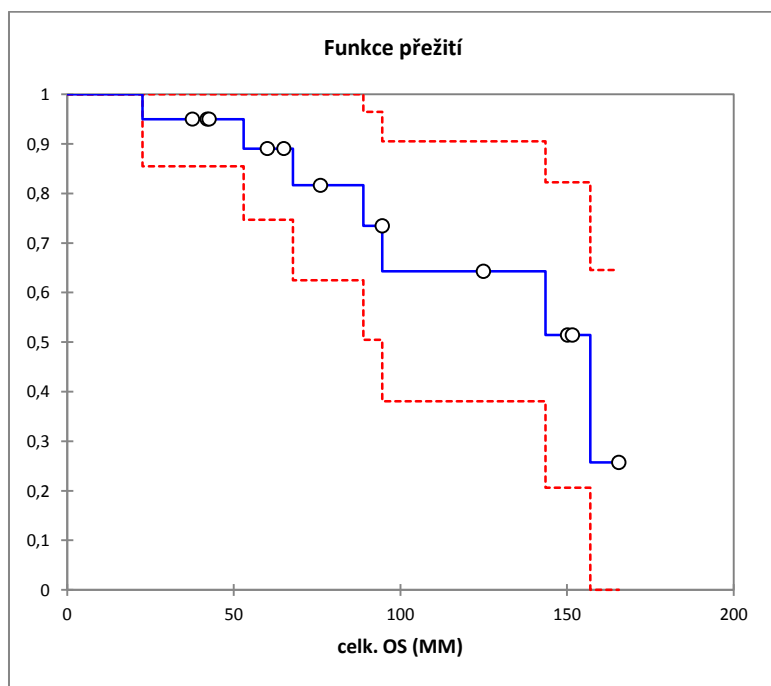
Tab. 17. Logistická regresní analýza závislosti monosomie chromosomu 10 na věku

V 19 případech byl nález zcela negativní (10x) nebo byla nalezena pouze polyploidie (9x), v těchto případech molekulárně-cytogenetická analýza byla neinformativní, nebyl významný rozdíl v přežití u pacientů s negativním FISH nálezem oproti ostatním pacientům. V ostatních případech korelovala provedená FISH s histologickým nálezem a klinickým průběhem.

Závěr: Nejvýznamnějším FISH nálezem u glioblastomu je polyploidie, je významným pozitivním znakem pro prognózu pacienta. Nejčastějším nálezem je monosomie chromosomu 10, pozitivní nález svědčí pro horší prognózu těchto pacientů, její výskyt stoupá s věkem pacienta.

Oligodendrogliom WHO Grade II

Do skupiny oligodendrogliomu, Gr. II bylo zařazeno celkem 18 pacientů, 11 pacientů přežívá, průměrná doba přežití je 124,4 měsíců (100,7 – 148,2 měsíců), od operace pak 53,5 měsíců (39,4 – 67,8 měsíců), medián přežití dosáhl 157 měsíců (zdrojová data Tab. 28). Medián přežití od operace nebyl dosažen, 1. kvartil dosáhl 26,6 měsíců. Průměrný věk při stanovení diagnózy byl 42,9 let. Medián celkového sledování byl 82 měsíců, medián sledování od operace dosáhl 43,5 měsíců. Průměrné Karnofsky skóre před operací bylo 93.



Graf 11. Křivka funkce přežití u pacientů s oligodendrogliomem, ○ cenzorovaná událost

Ve 13 vzorcích byla nalezena kombinovaná delece 1p36 a 19q13.3 (obr. 10 a 11), v 5 vzorcích byl nález negativní. Polyploidie byla nalezena 7x, monosomie chromosomu 10 a trisomie chromosomu 7 v jednom případě. Amplifikace *EGFR* a monosomie chromosomu 17 byly rovněž zjištěny vždy v jednom případě. Delece *CDKN2A* a delece *RBI* nebyly ve vzorcích oligodendrogliomu zachyceny. Kaplan-Meierovu analýzu skupiny rozdělené na vzorky s nálezem kombinované delece 1p/19q a bez nálezu této kombinované delece zatím nelze hodnotit vzhledem k malému počtu sledovaných událostí (úmrtí pacienta). Coxův regresní model stanovil jako statisticky signifikantní parametr přežití v této skupině pouze Karnofsky skóre před operací, ostatní parametry přežití v této skupině významně neovlivnily.

Regresní koeficienty:

Variable	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Hazard ratio	Hazard ratio Lower bound (95%)	Hazard ratio Upper bound (95%)
KPS	-0,236	0,095	6,196	0,013	0,790	0,655	0,951
věk při dg.	0,032	0,040	0,645	0,422	1,033	0,955	1,118
1p/19q-0	1,484	1,222	1,474	0,225	4,411	0,402	48,415

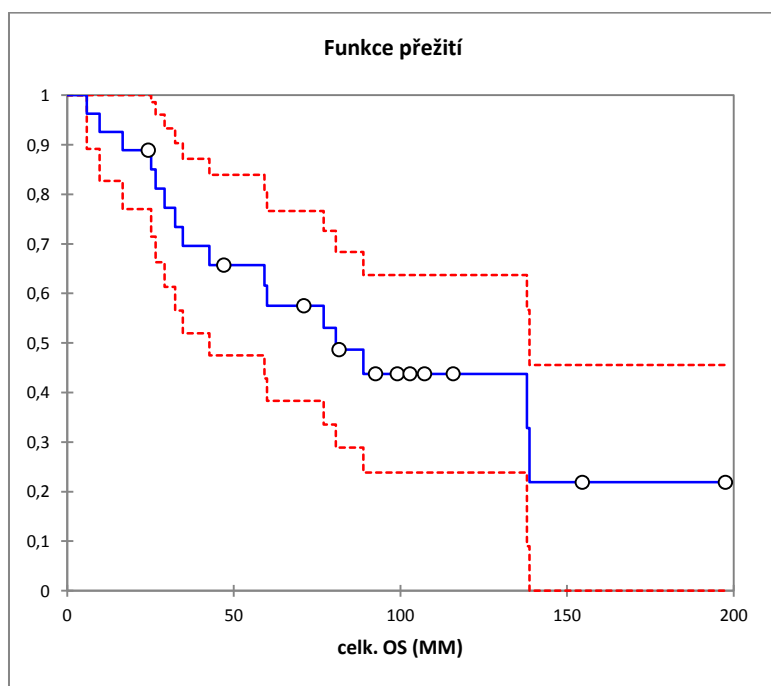
Tab. 18. Coxův regresní model celkového přežití pacientů s oligodendrogliomem Gr. II v závislosti na KPS, věku a zjištěných chromosomových aberacích (0 – aberace nezjištěna)

Korelace FISH, klinického průběhu a histologické analýzy v této skupině byla pozorována ve všech případech, ve 3 případech byla nalezena další aberace, která ale neovlivnila celkovou dobu přežití u těchto pacientů. Ta je v našem souboru závislá především na Karnofsky skóre před operací.

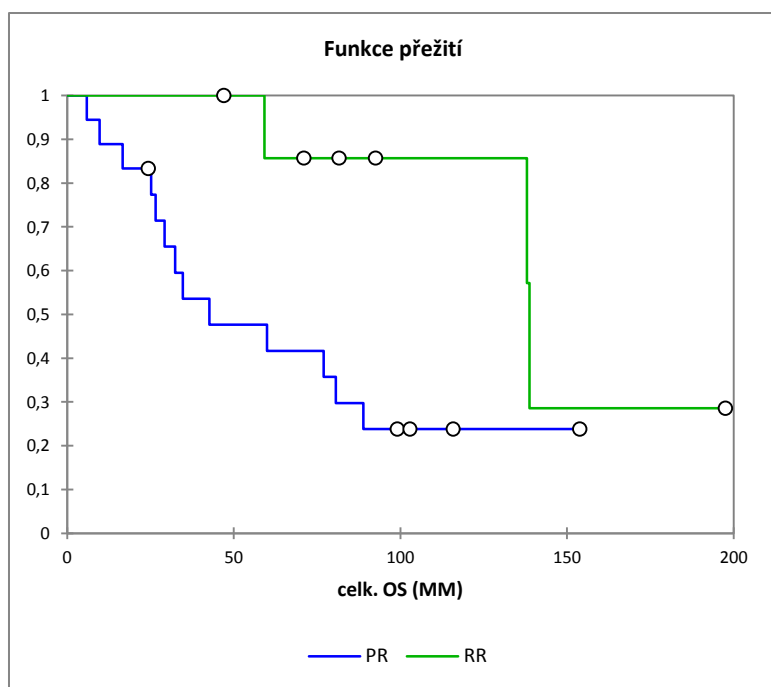
Závěr: U pacientů s oligodendrogliomem nález jiné aberace neovlivnil v našem souboru celkovou dobu přežití

Anaplastický oligodendrogliom WHO Grade III

V souboru bylo celkem 27 pacientů s anaplastickým oligodendrogliomem, Gr. III, do současné doby přežívá 11 pacientů (zdrojová data Tab. 29). Medián přežití dosáhl 80,6 měsíců, medián přežití po operačním výkonu 36,5 měsíců, průměrná doba přežití byla 85,4 měsíců (64,9 – 105,8 měsíců), průměrná doba přežití od operace dosáhla 48 měsíců (35,7 – 60,4 měsíců). Průměrný věk pacientů k datu stanovení diagnózy byl 44,7 let. Medián sledování dosáhl 65 měsíců, medián sledování od operace byl 30 měsíců. Průměrné Karnofsky skóre pacientů před operací bylo 90.



Graf 12. Křivka funkce přežití u pacientů s anaplastickým oligodendrogliomem,
○ cenzorovaná událost



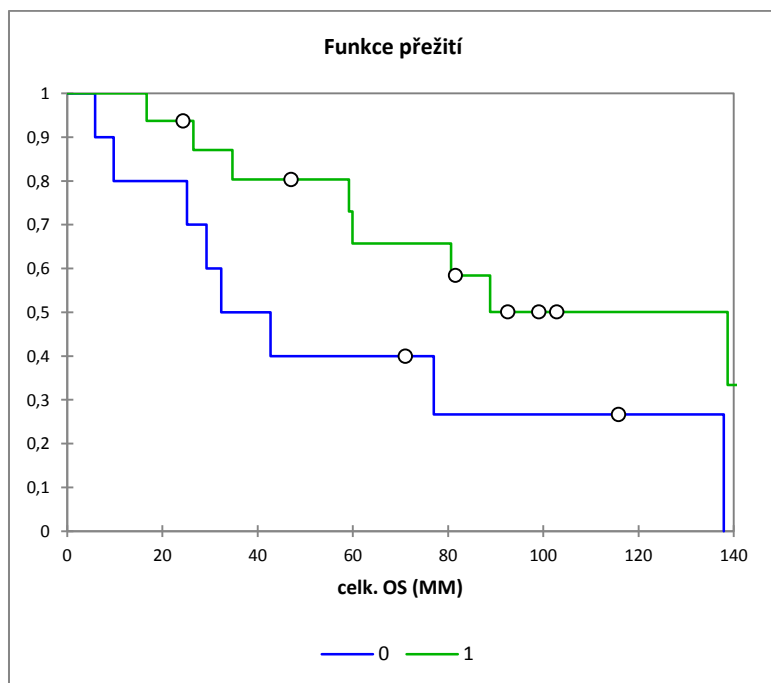
Graf 13. Srovnání křivek funkce přežití u pacientů s anaplastickým oligodendrogliomem v závislosti na radikalitě resekce (RR – radikální resekce, PR – parciální resekce), ○ cenzorovaná událost

Test	Observed value	Critical value	p-value	alpha
Log-rank	4,426	3,841	0,035	0,050
Wilcoxon	5,827	3,841	0,016	0,050
Tarone-Ware	5,587	3,841	0,018	0,050

Tab. 19. Porovnání funkcí přežití (DF = 1)

Skupina pacientů, kteří podstoupili radikální resekci dosáhla mediánu přežití 138,7 měsíců, pacienti s parciální resekci pouze 59,9 měsíců. Pro další analýzu bylo k dispozici 26 vzorků. Stejně jako u oligodendrogliomů byla nejčastějším FISH nálezem kombinovaná delece 1p36 a 19q13.3 (62%). Polyploidie byla nalezena v 9 vzorcích (35%). Monosomie chromosomu 10 byla zjištěna v jednom případě, trisomie chromosomu 7 byla nalezena 2x, amplifikace *EGFR* jednou. Delece *CDKN2A* byla zjištěna 3x, z toho dvakrát jako bialelická delece v kombinaci s monosomií chromosomu 9. Delece *RBI* v této skupině detekována nebyla. Srovnání odhadu přežití bylo nejprve stanoveno ve skupině s nálezem kombinované delece 1p36 a 19q13.3 a ve skupině s negativním nálezem této delece. Ve skupině

s pozitivním nálezem 1p/19q dosáhl medián přežití 138,7 měsíců, ve skupině s negativním nálezem této delece byl medián přežití pouze 42,7 měsíců.



Graf 14. Srovnání křivky funkce přežití u pacientů s anaplastickým oligodendrogliomem Grade III v závislosti na přítomnosti kombinované delece 1p/19q ve vyšetřovaném vzorku (0 – negativní nález, 1 – pozitivní nález), ○ cenzorovaná událost

Statistic	Observed value	Critical value	p-value	alpha
Log-rank	4,034	3,841	0,045	0,050
Wilcoxon	3,786	3,841	0,052	0,050
Tarone-Ware	3,843	3,841	0,050	0,050

Tab. 20. Porovnání funkcí přežití (DF = 1)

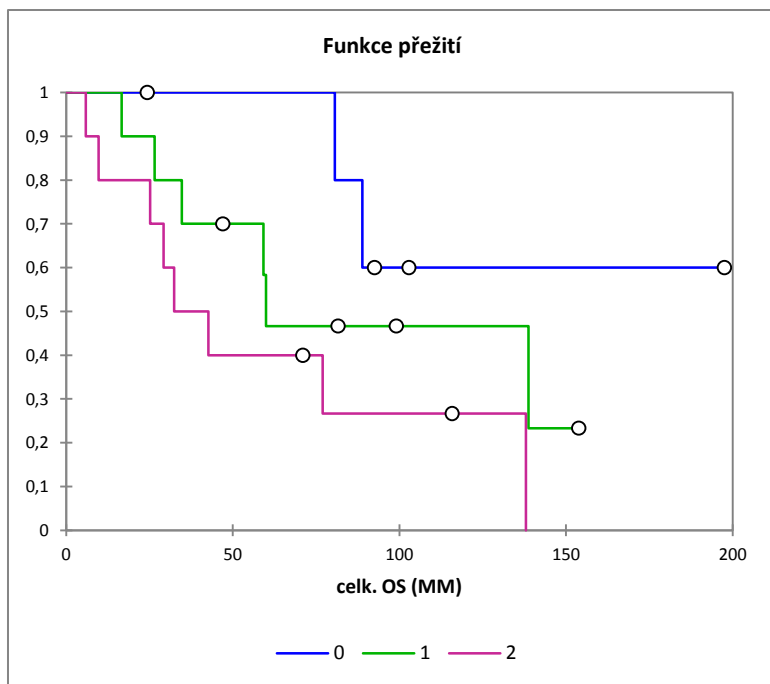
Regresní koeficienty:

Variable	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Hazard ratio	Hazard ratio Lower bound (95%)	Hazard ratio Upper bound (95%)
1p/19q-1	-1,099	0,538	4,180	0,041	0,333	0,116	0,956
polyp1-1	-0,617	0,599	1,063	0,302	0,539	0,167	1,744
jina-0	-0,450	0,567	0,630	0,427	0,638	0,210	1,936

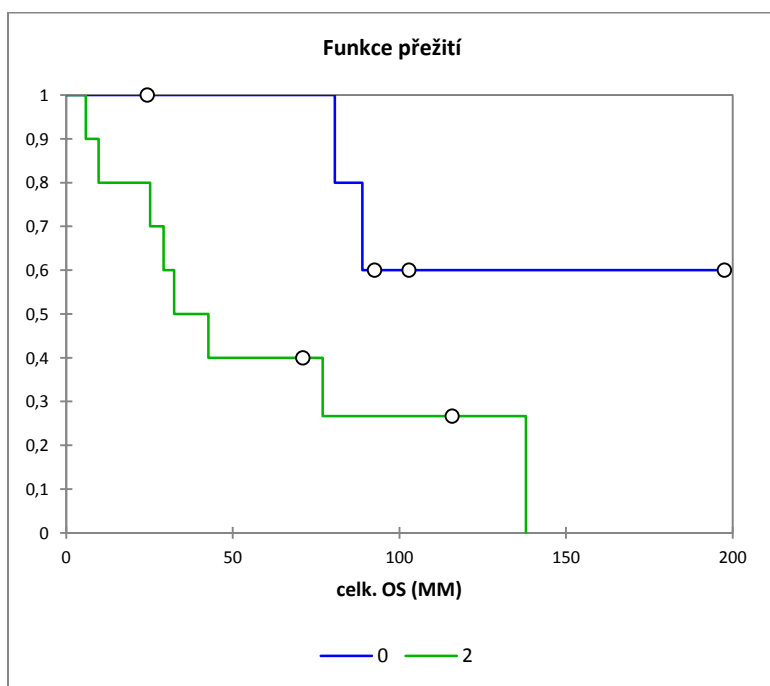
Tab. 21. Coxův regresní model celkového přežití v závislosti na přítomných aberacích (1 – aberace nalezena, 0 – aberace nezjištěna)

Při stanovení významnosti jednotlivých aberací jsme vytvořili regresní model, který potvrdil známý fakt, že nejvýznamnějším molekulárně-cytogenetickým parametrem přežití u oligodendrogliálních nádorů je delece 1p a 19q, její přítomnost v nádorovém vzorku snižuje riziko úmrtí pacienta (funkce hazardu 0,33). Soubor byl definován z hlediska přítomnosti delece 1p/19q, polyploidie a jiné aberace (delece *CDKN2A*, monosomie 10, monosomie 9, trisomie 7, amplifikace *EGFR*)

Pokud byla skupina anaplastických oligodendrogliomů s pozitivním nálezem kombinované delece 1p36 a 19q13.3 rozdělena na skupinu s průkazem pouze kombinované delece 1p36 a 19q13.3, dále na skupinu kombinované delece 1p36 a 19q13.3 a jiné chromosomové aberace (např. delece *CDKN2A*, monosomie 10) a nakonec skupinu bez této kombinované delece, pak Kaplan-Meierova analýza prokázala delší přežití ve skupině pouze kombinované delece 1p36 a 19q13.3 – první kvartil byl 89 měsíců (mediánu přežití nebylo dosaženo), pokud je přítomna v nádoru další aberace (delece *CDKN2A*, amplifikace *EGFR*, monosomie 10, monosomie 9), medián přežití pak klesá na 60 měsíců, ve skupině bez delece 1p a 19q medián přežití dosáhl pouze 43 měsíců. Příznivý efekt kombinované delece 1p36 a 19q13.3 se ztrácí při přítomnosti dalších chromosomových aberací. Přes jasný trend ale vzhledem k malému počtu pacientů v souboru není toto srovnání hraničně statisticky signifikantní. Když jsme ale porovnali skupinu s průkazem pouze delece 1p/19q a skupinu bez této delece, pak byl rozdíl v přežití statisticky významný.



Graf 15. Srovnání křivky funkce přežití u pacientů s anaplastickým oligodendrogliomem Grade III v závislosti na přítomnosti kombinované delece 1p/19q (0) nebo na přítomnosti kombinované delece 1p/19q + jiné chromosomové aberace (1) nebo bez průkazu kombinované delece 1p/19q (2), ○ cenzorovaná událost



Graf 16. Srovnání křivky funkce přežití u pacientů s anaplastickým oligodendrogliomem Grade III v závislosti na přítomnosti pouze kombinované delece 1p/19q (0) nebo bez průkazu kombinované delece 1p/19q (2), ○ cenzorovaná událost

Test	Observed value	Critical value	p-value	alpha
Log-rank	3,903	3,841	0,048	0,050
Wilcoxon	4,158	3,841	0,041	0,050
Tarone-Ware	4,109	3,841	0,043	0,050

Tab. 22. Porovnání funkcí přežití (DF = 1)

Pokud jsme hodnotili celkové přežití v závislosti na Karnofsky skóre před operací a přítomných aberacích, pak statisticky významným parametrem je jednak samotné KPS, ale rovněž jiné aberace než kombinovaná delece 1p/19q a než polyploidie. Přítomnost jiné aberace zvyšuje v tomto modelu riziko úmrtí 3,9x, vyšší Karnofsky skóre toto riziko snižuje. Pokud jsme do tohoto modelu zavzali i věk, pak věk a KPS jsou statisticky významné faktory, které nejzásadněji ovlivňují celkové přežití a ostatní parametry již tak významné nejsou.

Regresní koeficienty:

Variable	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Hazard ratio	Hazard ratio Lower bound (95%)	Hazard ratio Upper bound (95%)
KPS	-0,123	0,039	9,963	0,002	0,884	0,819	0,954
1p/19q-0	0,747	0,583	1,644	0,200	2,112	0,674	6,620
polyp1-1	-0,447	0,605	0,544	0,461	0,640	0,195	2,095
jina-1	1,356	0,675	4,038	0,044	3,880	1,034	14,559

Tab. 23. Coxův regresní model přežití u anaplastického oligodendrogliomu v závislosti na KPS a prokázané aberaci (1 – aberace nalezena, 0 – aberace nezjištěna)

Regresní koeficienty:

Variable	Value	Standard error	Wald Chi-Square	Pr > Chi2	Hazard ratio	Hazard ratio Lower bound (95%)	Hazard ratio Upper bound (95%)
věk při dg.	0,108	0,038	8,170	0,004	1,114	1,035	1,200
KPS	-0,080	0,037	4,639	0,031	0,923	0,858	0,993
1p/19q-0	0,676	0,667	1,029	0,311	1,966	0,532	7,264
polyp1-1	-0,671	0,655	1,047	0,306	0,511	0,142	1,847
jina-1	0,777	0,666	1,360	0,244	2,175	0,589	8,027

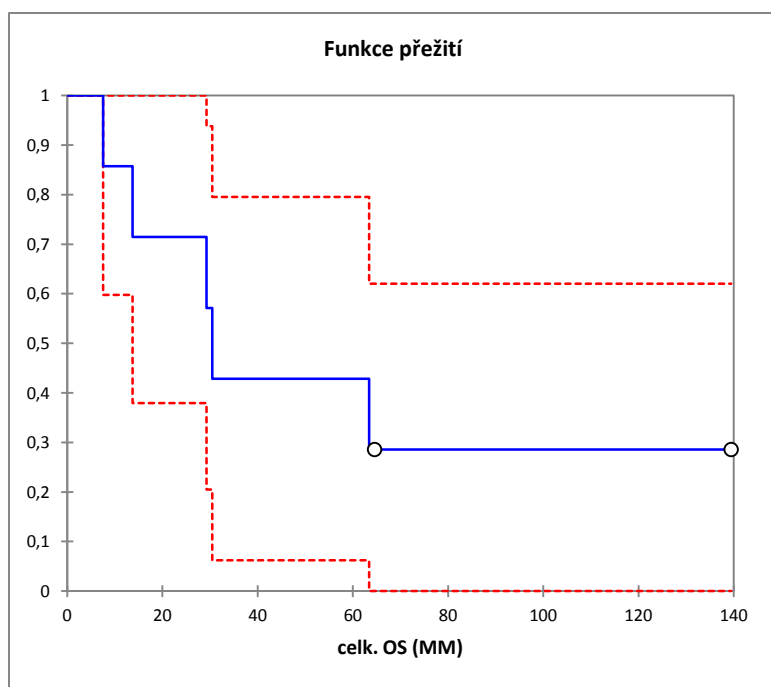
Tab. 24. Coxův regresní model celkového přežití u pacientů s anaplastickým oligodendrogliomem v závislosti na věku, KPS a prokázané aberaci (1 – aberace nalezena, 0 – aberace nezjištěna)

Korelace FISH, histologie a klinického průběhu byla dosažena v 21 případech. Ve 4 vzorcích nebyl prokázán žádný patologický nález, jednalo se o pacienty s kratším celkovým přežitím a nelze tak vyloučit špatný odběr. V jednom vzorku byla nalezena pouze amplifikace *EGFR*, opět se jednalo o pacienta s krátkým celkovým OS, pravděpodobně se jednalo o glioblastom (i dle MR obrazu). V jednom případě provedená FISH prokázala kombinovanou delecí 1p/19q společně s polyploidií, klinický průběh s kratším OS byl v rozporu s očekávanou delší prognózou.

Závěr: Kombinovaná delecce 1p/19q je pozitivním znakem prognózy pacientů s anaplastickým oligodendrogliomem. Přítomnost jiné aberace významně zhoršuje prognózu především u pacientů bez průkazu kombinované delecce, ovlivňuje celkové přežití ale i u pacientů s průkazem kombinované delecce 1p/19q.

Anaplastický oligoastrocytom WHO Grade III

Skupinu pacientů s anaplastickým oligoastrocytomem, Gr. III, tvoří 7 nemocných, z nich přežívají 2 pacienti (zdrojová data Tab. 30). Medián přežití dosáhl 30,4 měsíců, medián přežití od operace pak byl 12,9 měsíců, průměrná doba přežití byla 50 měsíců (20 – 57,4 měsíců), průměrná doba přežití od operace dosáhla 35 měsíců (13,7 – 56,1 měsíců). Průměrný věk pacientů při stanovení diagnózy byl 40,4 let. Medián sledování dosáhl 30,4 měsíců, medián sledování od operace pak 29,3 měsíců. Průměrné Karnofsky skóre před operací bylo 89.



Graf 16. Křivka funkce přežití pacientů s anaplastickým oligoastrocytomem, ○ cenzorovaná událost

Ve skupině smíšených gliomů (oligoastrocytomů) byly nalezeny pouze anaplastické oligoastrocytomy (WHO grade III). Jednalo se celkem o 6 vzorků. Delece 1p byla nalezena jednou, kombinovaná delece 1p/19q také pouze jednou. Nejčastějším nálezem byla polyploidie, zjištěna 6x. Dále ve dvou případech byla nalezena monosomie chromosomu 10, jedenkrát v kombinaci s trisomií chromosomu 7 a jedenkrát v kombinaci s delecí *CDKN2A* a amplifikací *EGFR* (kombinace amplifikace *EGFR* a delece *CDKN2A* byla zjištěna celkem 2x). Delece *RBI* nalezena nebyla. Přestože v tomto případě jde o velmi malou skupinu, i zde je možné říci, že pozitivní nález delece 1p a 19q je příznivým prognostickým parametrem, ve skupině s neg. nálezem dosáhl medián přežití pouze 30,4 měsíců, ve druhé skupině 63,4 měsíců, nicméně vzhledem k počtu pacientů v této skupině nelze výsledek zatím považovat za statisticky signifikantní. Korelace FISH, klinického průběhu a histologické analýzy byla v této skupině pozorována v 5 hodnocených vzorcích, v jednom případě molekulárně-cytogenetická analýza predikovala horší klinický průběh oproti skutečnosti.

Závěr: I ve skupině nemocných s anaplastickým oligoastrocytomem je patrný trend lepší prognózy u pacientů s průkazem kombinované delece 1p/19q

5. Diskuse

Gliomy jsou heterogenní skupina nádorů, které se značně liší svou prognózou. Nejčastěji se jedná o astrocytární nádory. Pilocytický astrocytom je typický nádor dětského věku, někdy se objevuje i u mladších dospělých jedinců. Teprve nedávno byl učiněn významný pokrok v hledání patogeneze těchto nádorů. Duplikace, fúze nebo mutace genu *BRAF* (7q34), prokázaná ve většině těchto nádorů, představuje pravděpodobně hlavní mechanismus vzniku těchto (v naprosté většině benigních) nádorů a tím pádem též cíl případné nové léčby^(43- 46). Aberace tohoto genu je pro pilocytický astrocytom typická. Zajímavé je, že podobná aberace bývá prokázána též v některých chondrosarkomech a maligních melanomech. V našem souboru bylo vyšetřováno celkem 7 pacientů, hodnoceno bylo ale pouze 6 vzorků. V našem vyšetřovacím panelu jsme nesledovali duplikaci či fúzi *BRAF* genu, proto v našich analýzách převažoval negativní nález nebo pouze průkaz polyploidie. Pouze v jednom z těchto vzorků byla nalezena monosomie chromosomu 10, následně bylo v dalším průběhu potvrzeno, že se nejedná o pilocytický astrocytom, histologie byla přehodnocena na difuzní astrocytom. Přestože jsme tuto aberaci prokázali v pilocytickém astrocytomu pouze jednou, můžeme z toho vyvodit, že jakýkoli nález tohoto typu budí vždy podezření na možnost chybného histologického závěru a tito pacienti by měli být pečlivě sledováni (ve stejném režimu jako pacienti s difuzním astrocytomem), eventuálně by mělo být provedeno druhé histologické čtení.

V současnosti je předpokládaným prvním patogenetickým procesem vzniku nízkostupňového gliomu mutace genu isocitrátdehydrogenázy 1 nebo 2 – *IDH1/2*^(47, 48) a tento jev nastává ještě před vznikem mutace *TP53*^(26, 47). Tyto mutace způsobují změnu aktivity tohoto enzymu tak, že na místo α -ketoglutarátu vzniká potenciální onkometabolit 2-hydroxyglutarát (kompetitivní inhibitor α -ketoglutarátu), který má inhibiční účinek na histondemethylázy a α -ketoglutarát dependentní deoxygenázy⁽⁴⁹⁾. Prevalence této mutace je

vysoká (80%) a zůstává neměnná i v průběhu progresu nádoru do anaplastického astrocytumu či sekundárního glioblastomu. Mutace je rovněž nacházena i v oligodendrogliálních nádorech. V současné době se předpokládá, že právě mutace *IDH1/2* je jedním z prvních stupňů v tumorigenezi gliálních nádorů ⁽²⁶⁾. Navíc je mutace *IDH1/2* velmi vzácně nalezena v primárním glioblastomu (méně než 5%) ⁽⁵⁰⁾. Domněnku, že mutace *IDH1* a *IDH2* může hrát roli v patogenezi mozkových gliomů podporuje navíc fakt, že tento typ postižení nacházíme i u určitého procenta pacientů s akutní myeloidní leukemií a chondrosarkomem ^(51, 52). Nicméně u pacientů s gliomy mozku představuje průkaz přítomnosti této mutace alespoň zčásti pozitivní prediktivní faktor, tito nemocní mají lepší prognózu než ti, u kterých tato mutace prokázána nebyla (zvláště pacienti s gemistocytárním astrocytomem, Gr. II) ^(53, 54). Na druhou stranu ale byly publikovány práce, které tento pozitivní vliv neprokázaly ^(26, 55). V současné době je možné prokázat nejčastěji se vyskytující mutaci *IDH1* (R132) i imunohistochemicky při histologické analýze. Zcela nedávná práce pak prokazala možnost detekovat přímo 2-hydroxyglutarát pomocí magnetické rezonanční spektroskopie a tak neinvazivně určit přítomnost této mutace v nádoru ⁽⁵⁶⁾.

U většiny pacientů s nízkostupňovým gliomem nacházíme rovněž mutaci genu *TP53*, pouze vzácně dochází k deleci příslušného genu ⁽²⁶⁾, tento fakt můžeme potvrdit i z našeho souboru pacientů, delece nebyla prokázána ani v jednom případě difúzního astrocytumu. Tato mutace je považována za nepříznivý prognostický znak ⁽⁵⁵⁾, pacienti nesoucí tuto mutaci mají kratší interval přežití. Nicméně prognóza nezávisí pouze na histologické a FISH analýze, prognosticky významným faktorem je věk nemocných a KPS, především pacienti mladší 45 let mají lepší prognózu prakticky u všech typů gliálních nádorů ^(57, 58). Mutace *TP53* genu je ale nalézána u astrocytárních nádorů všech stupňů malignity. Gen *TP53* je mutován v cca 50% difúzních astrocytomů a anaplastických astrocytomů, ale pouze ve 30% glioblastomů ⁽²⁶⁾.

Nicméně v některých nízkostupňových gliomech (dle histologické analýzy) byly naopak nalezeny aberace, které odpovídají nádorům vyššího grade a bylo prokázáno, že u těchto nádorů dochází k malignímu zvratu dříve. Jsou to především delece *RBI* a *CDKN2A*, dále trisomie chromosomu 7 a monosomie chromosomu 10. Na druhou stranu v našem souboru byli pacienti, kteří zemřeli na rychle progredující gliální nádor a u kterých nebyla nalezena žádná ze sledovaných aberací, v těchto případech musíme ale předpokládat, že se jednalo o špatný odběr vzorku na histologickou i FISH analýzu. Přesto i v našem souboru byl patrný jednoznačný trend, který prokazuje nejlepší prognózu u pacientů s difuzním astrocytomem, pokud je molekulárně-cytogenetická analýza negativní v panelu námi prováděných vyšetření. Tento fakt lze ale prokázat spíše dlouhodobým sledováním, vždy je nutné počítat s možností špatného odběru a tím falešně negativním výsledkem. Naopak výrazně horší prognózu lze očekávat, pokud byla prokázána další chromosomová aberace (delece *RBI*, *CDKN2A*, trisomie 7, monosomie 10), medián přežití byl v této skupině pouze 37,5 měsíců. Již v naší původní práci jsme předpokládali, že tyto další aberace mohou vést k rychlejšímu upgradingu difuzního astrocytoma⁽⁵⁹⁾. Na základě delšího sledování a pomocí statistické analýzy jsme mohli tento předpoklad potvrdit. Kaplan-Meierova analýza funkce přežití pak potvrdila statisticky signifikantní rozdíl mezi jednotlivými křivkami přežití. Riziko přítomnosti jiné aberace bylo potvrzeno i v Coxově regresním modelu, funkce hazardu dosáhla 3,8. Toto vysoké riziko úmrtí při přítomnosti jiné aberace než polyploidie zůstalo jediným významným faktorem, který ovlivňuje celkové přežití a je nutné jej považovat za vysoce statisticky významný a zásadní ukazatel horší prognózy. Svědčí pro zvýšené riziko upgradingu difuzního astrocytoma. Tento výsledek navíc znamená, že přítomnost jiné aberace je nezávislý faktor a ostatní významné faktory (věk, Karnofsky skóre, radikalita resekce) tomto případě nehrají (alespoň v našem souboru) zásadní roli^(59, 60, 61). Na druhou stranu u tří našich pacientů nebyla nalezena žádná aberace a přesto došlo k progresi nádoru. Je tedy

zřejmé, že existují ještě jiné faktory, které na molekulární úrovni ovlivňují přežití těchto pacientů a které je nutné identifikovat. Nicméně zásadním sdělením pro praxi je, že přítomnost jiné aberace vyžaduje jiný protokol sledování pacienta, protokol, který odpovídá vysokostupňovým gliomům.

U anaplastických astrocytomů nacházíme podobné (ale častěji) aberace jako u difuzních astrocytomů, zvláště pak ve vyšším procentu delecí *CDKN2A* (často bialelická). Rovněž častějším nálezem bývá delece *RBI* genu. Při analýze této skupiny jsme zjistili, že podobně jako u difuzních astrocytomů přítomnost jiných aberací ovlivňuje prognózu pacientů. I u těchto nádorů je příznivým znakem v našem panelu vyšetření pro prognózu negativní molekulárně-cytogenetický nález, případně polyploidie, nález jiné aberace prognózu opět zhoršuje (medián přežití 52 měsíců oproti 14 měsícům při nálezu jiných aberací). Překvapivé ovšem bylo, že na této horší prognóze se u našich pacientů nepodílí delece *CDKN2A* ^(62, 63). Ta sama o sobě zásadněji přežití neovlivňuje a naopak signifikantním nálezem jsou jiné aberace (delece *RBI*, monosomie chromosomu 9, trisomie chromosomu 7, amplifikace *EGFR*, monosomie chromosomu 10, monosomie chromosomu 17) ⁽⁶⁴⁾. Toto jsme potvrdili i Kaplan-Meierovou analýzou obou skupin, ve skupině 1 (jiné aberace) dosáhl medián přežití pouze 26,4 měsíců, ve skupině 0 (bez těchto aberací) byl pak medián přežití 81,3 měsíců. Již v naší původní práci byla role delecí *CDKN2A* nejasná, z celkem deseti pacientů s delecí *CDKN2A* došlo u několika z nich k rychlé progresi, naopak někteří z nich přežívali déle. Do současné doby přežívá jeden pacient ⁽⁵⁹⁾. Podobně jako u difuzního astrocytomu je považován za pozitivní prognostický faktor i průkaz mutace *IDH1* R132H v nádoru, pacienti s pozitivním nálezem mají lepší prognózu oproti pacientům s negativním nálezem této mutace ⁽⁶⁵⁾. Věk, Karnofsky skóre a radikalita resekce jsou ale v našem souboru nejvýznamnější faktory ovlivňující přežití. Oproti našemu původnímu závěru je ale role některých aberací ve smyslu horší prognózy pacientů s anaplastickým astrocytomem nesporná.

Většina glioblastomů vzniká velmi rychle, bez předchozích známek méně maligní léze. Jsou označovány jako de novo neboli primární glioblastomy. Anamnéza je většinou velmi krátká (méně než 3 měsíce). Sekundární glioblastomy vznikají pomalu progresí difúzního či anaplastického astrocytomy. Při MRI vyšetření mozku nacházíme patologické ložisko s centrální nekrózou a okolním enhancujícím lemem a výrazným kolaterálním edémem (viz obr. 2). U sekundárního glioblastomu se toto enhancující ložisko nachází v nízkostupňovém gliomu a odlišuje se svým charakterem od okolní nádorové tkáně.

Primární glioblastomy vznikají většinou u starších pacientů (stř. věk 55 let). Pravidelně bývají detekovány homozygotní delece *CDKN2A*, *CDKN2B* a *p14^{ARF}* v oblasti 9p21. *CDKN2A* a *p14^{ARF}* (kódují p16 a p14^{ARF}) se nachází na stejném lokusu (9p21). Produkty těchto genů jsou transkribovány z odlišných promotorů a prvních exonů (exon 1a a 1b), ale sdílí stejný exon 2 a 3, přičemž používají odlišný čtecí rámec pro translaci. *CDKN2B* je lokalizován pouze o 11kb směrem k centromere od lokusu pro *CDKN2A/p14^{ARF}*. Tento úsek chromosomu 9 bývá deletován v 50% glioblastomů a cca v 10% anaplastických astrocytomů^(13, 27,28). Ztrátou obou alel *CDKN2A/B* a *p14^{ARF}* tak dochází k přerušení cesty p53 i Rb1. V některých nádorech může být transkripce zastavena díky hypermethylaci promotorového úseku zbývající divoké alely^(30, 66). Nedávno byla popsána i možnost zapojení p18 do tumorigeneze glioblastomu⁽⁶⁷⁾, v některých nádorech byla popsána současná delece *CDKN2A* a *CDKN2C*. Častým nálezem bývá i amplifikace *CDK4* často společně s *MDM2* na 12q14-q15. Amplifikace *CDK4* byla nalezena u 18% glioblastomů, amplifikace *MDM2* asi ve 14% případů glioblastomu. Vzestup *CDK4* vede k překonání regulace pomocí inhibičních p15 a p16 (produkty *CDKN2A* a *CDKN2B*). Volný *CDK4* a *CDK6* se pak vážou na cykliny D1/D3. Zvýšená exprese *MDM2* vede ke zvýšené degradaci p53, přičemž opět překonává inhibiční účinek p14^{ARF}^(13, 27). V 7% glioblastomů byla nalezena amplifikace *MDM4*, homologu *MDM2*⁽²⁸⁾. U 70% primárních glioblastomů nacházíme monosomii chromosomu

10 či delecí 10q. U 25% vzorků je zjištěna mutace ve zbývajícím *PTEN* genu. Amplifikace genu *EGFR* (7p11-p12) je detekována v cca 45% glioblastomů ⁽¹³⁻¹⁷⁾ a v malé části anaplastických astrocytomů, u další části není přítomna amplifikace, ale nechybí zvýšená exprese ⁽¹³⁾. Četnost těchto aberací je v našem souboru obdobná. Pokud je gen amplifikován, je vždy zvýšeně exprimován (tato overexprese může být u glioblastomu ale přítomna i bez amplifikace). Amplikon je často velký (nejméně 1,5 Mb) a vyskytuje se ve formě double minutes ⁽³⁴⁾. Přestavba samotného genu se vyskytuje zhruba v polovině případů amplifikace *EGFR*, a to pouze v amplifikovaných kopiích ⁽¹⁷⁾. Nejčastěji se vyskytující přestavbou je aberantní spojení při transkripci, které vede ke ztrátě 267 aminokyselin extracelulární domény, která není schopna vázat ligand a receptor je trvale aktivován tzv. EGFRvIII ^(18, 19, 20). Vedle toho se vyskytují méně často i přestavby intracelulární domény EGF receptoru. Tyto přestavby (extra i intracelulární domény) se mohou vyskytovat i ve stejném nádoru. Ve všech astrocytárních nádorech byla nalezena vysoká exprese PDGF ligandů, naznačující přítomnost autokrinní/parakrinní stimulace. Intracerebrální aplikace retroviru obsahujícího *PDGFRB* vedla u myši ke vzniku glioblastomu, což naznačuje zapojení PDGF systému v patogenezi astrocytomů ^(34, 68). Přesto overexprese není spojena s amplifikací (výjimkou je amplifikace *PDGFRA*, genu pro receptor PDGF- α , popsaná u glioblastomů – cca 13%) ⁽¹⁵⁾.

Sekundární glioblastomy vznikají pomalu progresí difúzního či anaplastického astrocytomu. Tyto glioblastomy postihují mladší jedince (stř. věk 40 let) a typicky je přítomna mutace *IDH1*, méně často *IDH2*, dále delece a/nebo mutace s postižením obou alel *TP53*. Z dalších abnormalit je často zjištěna delece *p14^{ARF}* nebo delece *RBI* genu, delece *CDKN2A* či amplifikace *CDK4*. Často je nalezena delece 10q (cca 60%), ale zbývajícím *PTEN* gen mutován nebývá. Pouze vzácně se vyskytuje amplifikace *EGFR* ⁽²⁶⁾. Tyto dva typy glioblastomu – primární (nově vzniklý) a sekundární (postupnou progresí) se odlišují v podstatě pouze dle klinického průběhu a MRI vyšetření mozku. Toto klasické dogma

rozdělení glioblastomů na dvě skupiny je sice již pomalu opouštěno ve světle nových poznatků o jednotlivých skupinách glioblastomů na podkladě molekulárně-genetické analýzy (4 skupiny) ^(50, 69), nicméně pro klinické hodnocení má stále své nezastupitelné místo. Primární glioblastom má velmi krátké období klinických příznaků před stanovením diagnózy (1-3 měsíce), většinou se jedná o bolesti hlavy, epileptický záchvat, ložiskový neurologický deficit. Pacienti se sekundárními glioblastomy jsou většinou již delší dobu dispenzarizováni a léčeni pro astrocytom nižšího grade (nejčastěji fibrilární astrocytom). Onemocnění může být po několik let relativně stabilní či pouze pomalu progreduje, pacienti jsou sledováni pomocí MRI vyšetření mozku. Po několika letech dochází k malignímu zvratu v nádoru, jeho upgradingu a akceleraci růstové aktivity. Tuto aktivitu můžeme zjistit pomocí MRI mozku, dochází k poškození hematoencefalické bariéry a sycení nádoru po podání kontrastní látky (gadolinium), dále pomocí FLT-PET vyšetření mozku (ložiska zvýšené mitotické aktivity). Otázka tohoto maligního zvratu je jednou z nejvíce problematických otázek v neuroonkologii. U sekundárního glioblastomu proto nacházíme i podobné chromosomové změny jako u astrocytomů Grade II a III, naopak pouze vzácně se objevují změny typické pro primární glioblastom, především amplifikace *EGFR* či *MDM2*. Glioblastomy nicméně mohou nést celou řadu aberací a bývá pravidlem, že bývá přítomno postižení více signálních cest najednou (p53, Rb1, RTK/Akt) ⁽¹¹⁻¹³⁾. V našem souboru jsme pozorovali především výskyt monosomie chromosomu 10 (68% případů). Pacienti s touto aberací mají v našem souboru horší prognózu přežití oproti těm, kde je nález negativní. Je zde i shoda mezi věkem pacienta a monosomií chromosomu 10. To může znamenat, že u starších pacientů najdeme častěji monosomii 10 a tento nádor má pravděpodobně vyšší maligní potenciál. Gen *MGMT* je lokalizován na 10q26. Hypermethylace jeho promotoru hraje zásadní roli v chemosenzitivitě na temozolomid. Otázkou zůstává, zda se na tom nějakým způsobem může podílet i často přítomná monosomie 10.

Častým nálezem bývá rovněž amplifikace *EGFR* a trisomie chromosomu 7 ⁽⁹⁶⁾, v našem souboru 43% (62/145) a 37% (53/145). Trisomie chromosomu 7 prognózu pacientů v našem souboru významně neovlivňuje (stejně tak delece *CDKN2A* – 40/145). Zajímavým ukazatelem je nepřítomnost amplifikace *EGFR*, při negativním nálezu této aberace stoupá v našem souboru riziko smrti (funkce hazardu 1,44). Mohlo by to znamenat, že pacienti s amplifikací *EGFR* obecně lépe reagují na onkologickou léčbu. Jedná se ale o data na hranici statistické významnosti. Amplifikace *EGFR* společně s trisomií se v našem souboru společně vyskytují poměrně vzácně. V našem souboru bylo pouze deset těchto pacientů, což nám nedovoluje činit jednoznačné závěry. Takto nízký současný výskyt je v kontrastu s jinými pracemi, i když se jednalo o malé soubory pacientů ^(97, 98). Pokud jsme ale stanovovali míru rizika jednotlivých aberací, jako statisticky významná se jevila pouze detekce monosomie chromosomu 10 (funkce hazardu: 0,57 při nepřítomnosti monosomie 10), amplifikace *EGFR* (funkce hazardu: 1,44 při nepřítomnosti amplifikace *EGFR*, a přítomnost polyploidie (funkce hazardu: 1,50 při nepřítomnosti polyploidie). Pokud jsme do hodnocení přibrali i věk a KPS, ukázalo se, že tyto parametry jsou pro celkové přežití nejvýznamnějšími faktory ^(70, 71, 72), ale přetrvává i význam polyploidie (funkce hazardu při nepřítomnosti polyploidie dosahuje 1,47). EGF receptor a jeho role u glioblastomu je již několik let cílem nových léčebných postupů biologické léčby (např. erlotinib, gefitinib).

V roce 2011 byla publikována práce, která naše dosavadní dělení na primární a sekundární glioblastom na základě klinického obrazu mění a která dělí glioblastomy na základě molekulárně genetických charakteristik. Práce vychází z projektu The Cancer Genome Atlas, který systematicky vyšetřoval 206 glioblastomů se zaměřením na jednotlivé signální cesty a jejich poruchy ^(13, 50, 69). Glioblastomy byly rozděleny do čtyř skupin na klasický, proneurální, neurální a mesenchymální subtyp glioblastomu. Klasický typ je charakterizován amplifikací *EGFR* a monosomií chromosomu 10, delecí *CDKN2A* a *PTEN*,

naopak nebývá přítomná mutace *TP53* ⁽⁶⁹⁾. Mesenchymální typ glioblastomu je charakterizován mutací či delecí (často homozygotní) genu *NFI* (17q11.2), dále mutací *TP53*, delecí *CDKN2A* ⁽⁷³⁾. Z dalších nálezů bývá přítomna též mutace *PTEN* a zvýšená exprese *MET* a *CHI3L1*. Proneurální typ je charakterizován zvýšenou expresí genu *PDGFRA* (často na podkladě amplifikace tohoto genu) a zároveň mutací *IDH1*, dále amplifikací *CDK4*, *CDK6* a méně i *MET* a *PIK3CA*. U tohoto typu glioblastomu bývá rovněž často přítomná mutace *TP53*. Vedle vysoké exprese *PDGFRA* je u tohoto subtypu rovněž vysoká exprese *OLIG2* (oligodendrocyte lineage transcription factor 2 – 21q22.11). Zvýšená exprese *OLIG2* vede k potlačení inhibičního účinku p21, a tím ke zvýšené proliferaci. Neurální typ glioblastomu se odlišuje od ostatních typů tím, že exprimuje neuronové markery jako *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* a *SLC12A* ^(13, 69, 74). Přesto ale pro naše klinické sledování je „starší“ rozdělení na primární a sekundární glioblastom výhodnější a lépe reflektuje klinický obraz.

Tumorigeneze oligodendrogliomů zůstává i nadále nejasná. Za nejvýznamnější nález a prognostický parametr je považována přítomnost delece 1p36 a 19q13.3. Jedná se o poměrně časný projev onemocnění a objevuje se pravděpodobně v brzké návaznosti na mutaci *IDH1/2* ⁽²⁶⁾. Tato kombinovaná delece je pozitivním ukazatelem pro prognózu přežití, především u anaplastických oligodendrogliomů a oligoastrocytomů ⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾. Nicméně nebyl nalezen žádný potenciální tumor-supresorový gen, který by mohl vysvětlit vznik nádoru. Oligodendrogliomy mají obecně lepší prognózu, a pacienti mohou přežívat mnoho (10 i více) let od stanovení diagnózy. Srovnání funkce přežití v závislosti na přítomnosti delece 1p36 a 19q13.3 vyznívá ve prospěch prodloužení celkového přežití při pozitivním nálezu této kombinované delece. Nicméně největší význam mají věk, Karnofsky skóre před operací a radikalita resekce. V našem souboru tyto parametry svým významem převažují, Kaplan-Meierova analýza souboru pacientů s anaplastickým oligodendrogliomem a přítomností delece 1p36 a 19q13.3 prokázala rozdíl v době přežití jednotlivých skupin, nicméně tento rozdíl byl na hranici

statistické významnosti. V našem původním souboru byl výskyt této kombinované delece vyšší (81,3 - 87,5%), v současné době dosahuje 72% u oligodendrogliomů a 62% u anaplastických oligodendrogliomů ⁽⁵⁹⁾. To je o něco méně než v literatuře udávaných cca 75-80%. Zároveň ale bylo v našem souboru 9 vzorků, kde byl výsledek FISH analýzy negativní (3 ve skupině oligodendrogliomů a 6 ve skupině anaplastických oligodendrogliomů z celkového počtu 44 vzorků), nelze tedy vyloučit, že vzorek mohl být odebrán ze zdravé tkáně. Ve skupině anaplastických oligodendrogliomů byl ale patrný ještě jeden ukazatel. Byla jím určitá shoda mezi věkem a výskytem jiných aberací (oproti nálezům 1p/19q a polyploidie). Mohlo by to znamenat, že pacienti se stoupajícím věkem mají horší prognózu nejenom díky věku samotnému ale rovněž díky přítomnosti těchto jiných aberací (funkce hazardu 3,88) a že ke zhoršení stavu těchto pacientů dochází pravděpodobně vlivem rychlejší progresy nádoru (podobně jako u glioblastomu). V našich předchozích sděleních jsme uvažovali především o vlivu delece *CDKN2A* na rychlejší progresi oligodendrogliomů, současná data svědčí pro všechny další aberace vedle delece 1p/19q (delece *CDKN2A*, amplifikace *EGFR*, monosomie 10, monosomie 9) a pro jejich vliv na celkové přežití ^(59, 78).

Určitou slabinou naší metodiky odběru tkáně v průběhu operace a zpracováním vzorku do buněčné suspenze by mohla být skutečnost, že následná FISH analýza není prováděna na identickém materiálu jako analýza imunohistochemická. To by teoreticky mohlo vést k chybnému odběru a tím falešně negativnímu výsledku. Na druhou stranu výtěžnost postupu, kdy jsou používány stejné preparáty pro histologickou diagnózu i molekulárně-cytogenetické vyšetření je podstatně nižší a vyžaduje složitější a technicky náročnější postup, především je nutné vzorky deparafinizovat. Kromě toho je FISH analýza tkáňových řezů limitována horší kvalitou mikroskopických preparátů, zvýšeným nespecifickým pozadím a vyšší frekvencí falešně pozitivních nálezů spojených se ztátou fluorescenčního signálu (tj. delecí a monosomií), která je zapříčiněna seříznutím některých jader na povrchu vzorku. Naopak

příprava suspenzí nádorových buněk je velmi jednoduchá a struktura všech buněk v suspenzi zůstává zachována. Takto připravené mikroskopické preparáty jsou kvalitní a vhodné pro FISH analýzu (cut-off pro detekci monosomií/delecí je maximálně 5%, pro detekci trisomií a amplifikací 2,5%). Řešením, které snižuje riziko chybného odběru, ale zachovává výhodu použití čerstvého materiálu, je odebírání více vzorků z různých míst. Každý odebraný vzorek je „rozpůlen“, jedna polovina je odeslána na histologickou analýzu, druhá polovina uložena do růstového média a odeslána k FISH analýze. Určitým kompromisem může být dodatečná analýza z parafinového řezu tam, kde primární molekulárně-cytogenetická analýza je negativní nebo je významný rozpor mezi výsledkem očekávaným a výsledkem získaným.

6. Závěry

Fluorescenční *in-situ* hybridizace na interfázních jádrech (I-FISH) gliálních nádorů mozku je metoda, kterou je možné použít pro diagnostiku chromosomových aberací v těchto nádorech.

1. Ve všech skupinách je věk, Karnofsky skóre před operací a radikalita resekce významným parametrem další prognózy pacientů.
2. Prokázali jsme, že systém odběru, transportu a vyšetření čerstvé tkáně jsou proveditelné, získaný materiál hodnotitelný a má významnou vypovídací hodnotu.
3. I-FISH je vhodným doplňkem imunohistochemické analýzy a umožňuje stanovení predikce dalšího vývoje a prognózy pacienta. Upřesňuje tak diagnostiku daného onemocnění.
4. U pacientů s difúzním astrocytmem je přítomnost jiné aberace než polyploidie vysoce rizikovým ukazatelem horší prognózy. Tito pacienti jsou sledováni podle protokolu odpovídajícím nádorům vyššího grade.
5. Nejvýznamnějším parametrem u glioblastomu je pozitivní nález polyploidie, potvrzuje lepší prognózu těchto pacientů. Nejčastějším nálezem u glioblastomu je monosomie chromosomu 10, jedná se o špatný prognostický znak, jeho vzestupný výskyt koreluje s věkem pacienta a svědčí pro kratší dobu přežití
6. U anaplastických oligodendrogliomů a oligastrocytomů je delece 1p36 a 19q13.3 znakem lepší prognózy, přítomnost jiné aberace je negativním prognostickým znakem

V několika případech jsme určili pomocí FISH diagnózu i tam, kde vlastní imunohistochemická analýza nevedla k jednoznačnému výsledku. Předpokládáme, že

v budoucnu molekulárně-cytogenetická analýza umožní individualizaci sledování a léčby pacientů s mozkovými gliomy.

Náš tým pokračuje s výzkumem gliálních nádorů. Rozšiřujeme diagnostiku těchto nádorů o nové markery (např. *IDH1* a *IDH2*, *BRAF*, methylační analýzu některých genů, především *MGMT*). Zaměřujeme se na skupinu nízkostupňových gliomů, u kterých budeme pomocí magnetické rezonanční spektroskopie a pozitronové emisní tomografie hledat v těchto nádorech místa s vyšším rizikem maligního zvratu, z těchto suspektních míst stereotakticky odebírat vzorky tkáně a těchto vzorků budeme provádět cytogenetickou analýzu a expresní profilování s cílem najít rizikový profil těchto nádorů, kde budeme předpokládat dříve nastupující upgrading a progresi nádoru do nádorů vyššího grade. V tomto úkolu využijeme i poznatky zjištěné a publikované v této práci.

7. Použitá literatura

1. Crocetti E, Trama A, Stiller C, Caldarella A, Soffietti R, Jaal J, Weber DC, Ricardi U, Slowinski J, Brandes A; RARECARE working group. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur J Cancer*. 2012 Jul;48(10):1532-42. Epub 2012 Jan 7.
2. Fleury A, Menegoz F, Grosclaude P, Daures JP, Henry-Amar M, Raverdy N, Schaffer P, Poisson M, Delattre JY. Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in France. *Cancer*. 1997 Mar 15;79(6):1195-202.
3. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol*. 2002 Oct;4(4):278-99. Review.
4. Bailey P, Cushing H. A Classification of Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis. Philadelphia: Lippincott; 1926.
5. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J. Amplification and overexpression of the EGF receptor gene in primary human glioblastomas. *J Cell Sci Suppl*. 1985;3:161-72.
6. Kramář F, Zemanová Z, Michalová K, Babická L, Ransdorfová Š, Kozler P, Netuka D. Patogeneze mozkových gliomů, I. část. Úvod do problematiky, patogeneze astrocytárních nádorů. *Čes. a slov. Neurol. Neurochir.*, 69/102, 2006, No. 5, p. 346–354.
7. Kramář F, Zemanová Z, Michalová K, Babická L, Ransdorfová Š, Kozler P, Netuka D. Patogeneze mozkových gliomů, II. část: Patogeneze oligodendrogliomů a gliomů v rámci dědičných onemocnění. *Čes. a slov. Neurol. Neurochir.*, 69/102, 2006, No. 6, p. 419–425.
8. Meek DW, Cox M. Induction and activation of the p53 pathway: a role for the protein kinase CK2? *Mol Cell Biochem*. 2011 Oct;356(1-2):133-8. Epub 2011 Jul 19. Review.
9. Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*. 1998 Sep 10;395(6698):124-5.
10. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 1998; 92: 725-34.
11. Jebelli JD, Hooper C, Garden GA, Pocock JM. Emerging roles of p53 in glial cell function in health and disease. *Glia*. 2012 Apr;60(4):515-25. doi:10.1002/glia.22268. Epub 2011 Nov 21.
12. Pines J. The cell cycle kinases. *Semin Cancer Biol* 1994; 5: 305-13.
13. Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1886-94.
14. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-12.
15. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1061-8. Epub 2008 Sep 4.
16. Fleming TP, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Oldfield EH, Aaronson SA, Ali IU. Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and

- epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res* 1992; 52: 4550-3.
17. Chaffanet M, Chauvin C, Laine M, Berger F, Chedin M, Rost N, Nissou MF, Benabid AL. EGF receptor amplification and expression in human brain tumours. *Eur J Cancer* 1992; 28: 11-7.
 18. Mischel PS, Nelson SF, Cloughesy TF. Molecular analysis of glioblastoma: pathway profiling and its implications for patient therapy. *Cancer Biol Ther*. 2003 May-Jun;2(3):242-7. Review.
 19. Ekstrand AJ, Longo N, Hamid ML, Olson JJ, Liu L, Collins VP, James CD. Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene* 1994; 9: 2313-20.
 20. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 2965-9.
 21. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 7727-31.
 22. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*. 1998 May 29;273(22):13375-8.
 23. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. 2007 Nov 1;21(21):2683-710. Review.
 24. Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67:878-887.
 25. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Backlund LM, Ichimura K, Collins VP. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res* 2008;68:8673-8677.
 26. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol*. 2011 Jul;28(3):177-83. Epub 2011 Mar 26. Review.
 27. Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J, Elkahoul AG, Meltzer PS, Collins VP. Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res* 1996; 56: 5141-5.
 28. Riemenschneider MJ, Büschges R, Wolter M, Reifenberger J, Boström J, Kraus JA, Schlegel U, Reifenberger G. Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. *Cancer Res*. 1999 Dec 15;59(24):6091-6.
 29. Schmidt EE, Ichimura K, Messerle KR, Goike HM, Collins VP. Infrequent methylation of CDKN2A(MTS1/p16) and rare mutation of both CDKN2A and CDKN2B(MTS2/p15) in primary astrocytic tumours. *Br J Cancer* 1997; 75: 2-8.
 30. Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res*. 1994 Dec 15;54(24):6353-8.
 31. Solomon DA, Kim JS, Jenkins S, Ransom H, Huang M, Coppa N, Mabanta L, Bigner D, Yan H, Jean W, Waldman T. Identification of p18 INK4c as a tumor suppressor

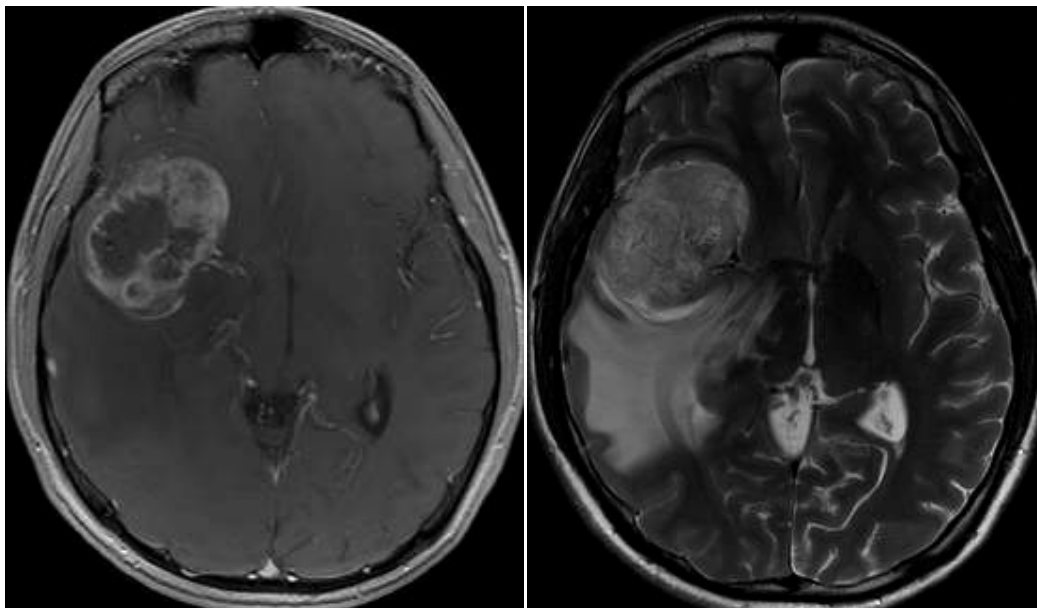
- gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 2008 Apr 15;68(8):2564-9. Epub 2008 Apr 1.
32. Goldhoff P, Clarke J, Smirnov I, Berger MS, Prados MD, James CD, Perry A, Phillips JJ. Clinical stratification of glioblastoma based on alterations in retinoblastoma tumor suppressor protein (RB1) and association with the proneural subtype. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012 Jan;71(1):83-9.
 33. Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest* 2001; 81: 77-82.
 34. Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, Gonzalez-Darder J, Quilis V, Monleon D, Celda B, Cerdá-Nicolas M. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol.* 2010 Jun;23(6):856-65. Epub 2010 Mar 19.
 35. Benito R, Gil-Benso R, Quilis V, Perez M, Gregori-Romero M, Roldan P, Gonzalez-Darder J, Cerdá-Nicolas M, Lopez-Gines C. Primary glioblastomas with and without EGFR amplification: relationship to genetic alterations and clinicopathological features. *Neuropathology.* 2010 Aug;30(4):392-400. Epub 2009 Dec 16.
 36. Dahlback HS, Brandal P, Meling TR, Gorunova L, Scheie D, Heim S. Genomic aberrations in 80 cases of primary glioblastoma multiforme: Pathogenetic heterogeneity and putative cytogenetic pathways. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009 Oct;48(10):908-24.
 37. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994; 145: 1175-90.
 38. Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A. Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1995 Jan;54(1):91-5.
 39. Trost D, Ehrler M, Fimmers R, Felsberg J, Sabel MC, Kirsch L, Schramm J, Wiestler OD, Reifenberger G, Weber RG. Identification of genomic aberrations associated with shorter overall survival in patients with oligodendroglial tumors. *Int J Cancer.* 2007 Jun 1;120(11):2368-76.
 40. Jeuken JW, Sprenger SH, Vermeer H, Kappelle AC, Boerman RH, Wesseling P. Chromosomal imbalances in primary oligodendroglial tumors and their recurrences: clues about malignant progression detected using comparative genomic hybridization. *J Neurosurg* 2002; 96: 559-64.
 41. Maintz D, Fiedler K, Koopmann J, Rollbrocker B, Nechev S, Lenartz D, Stangl AP, Louis DN, Schramm J, Wiestler OD, von Deimling A. Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997 Oct;56(10):1098-104.
 42. Jeuken JW, Boots-Sprenger SH, Wesseling P. Chromosomal imbalances in oligodendroglial tumors as detected by comparative genomic hybridization (CGH). In: Zhang W, Fuller GN(eds) *Genomic and Molecular Neuro-Oncology*. Sudbury MA: Jones and Bartlett Publishers; 2004. p. 185-198.
 43. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, Toedt G, Wittmann A, Kratz C, Olbrich H, Ahmadi R, Thieme B, Joos S, Radlwimmer B, Kulozik A, Pietsch T, Herold-Mende C, Gnekow A, Reifenberger G, Korshunov A, Scheurlen W, Omran H, Lichter P. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest.* 2008 May;118(5):1739-49.

44. Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008 Sep;67(9):878-87.
45. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, Collins VP. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res*. 2008 Nov 1;68(21):8673-7.
46. Sievert AJ, Jackson EM, Gai X, Hakonarson H, Judkins AR, Resnick AC, Sutton LN, Storm PB, Shaikh TH, Biegel JA. Duplication of 7q34 in pediatric low-grade astrocytomas detected by high-density single-nucleotide polymorphism-based genotype arrays results in a novel BRAF fusion gene. *Brain Pathol*. 2009 Jul;19(3):449-58. Epub 2008 Oct 21. Erratum in: *Brain Pathol*. 2009 Jul;19(3):550.
47. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batnisch-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):765-73.
48. Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R, Kumabe T, Tominaga T. New insights into glioma classification based on isocitrate dehydrogenase 1 and 2 gene status. *Brain Tumor Pathol*. 2011 Jul;28(3):203-8. Epub 2011 Jul 7. Review.
49. Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkissoon S, Losman JA, Joensuu P, Bergmann U, Gross S, Travins J, Weiss S, Looper R, Ligon KL, Verhaak RG, Yan H, Kaelin WG Jr. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*. 2012 Feb 15;483(7390):484-8. doi:10.1038/nature10898.
50. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008 Sep 26;321(5897):1807-12. Epub 2008 Sep 4.
51. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Whitman SP, Becker H, Schwind S, Metzeler KH, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, Bloomfield CD. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2010 May 10;28(14):2348-55. Epub 2010 Apr 5.
52. Arai M, Nobusawa S, Ikota H, Takemura S, Nakazato Y. Frequent IDH1/2 mutations in intracranial chondrosarcoma: a possible diagnostic clue for its differentiation from chordoma. *Brain Tumor Pathol*. 2012 Feb 10. [Epub ahead of print]
53. Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, Watanabe M, Suzuki H, Kato S, Ishioka C, Tominaga T. IDH1/2 gene status defines the prognosis and molecular profiles in patients with grade III gliomas. *Int J Clin Oncol*. 2011 Oct 6. [Epub ahead of print]
54. Hartmann C, Hentschel B, Tatagiba M, Schramm J, Schnell O, Seidel C, Stein R, Reifenberger G, Pietsch T, von Deimling A, Loeffler M, Weller M; German Glioma Network. Molecular markers in low-grade gliomas: predictive or prognostic? *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 1;17(13):4588-99. Epub 2011 May 10.
55. Kim YH, Nobusawa S, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, Sure U, Wrede K, Nakazato Y, Vital A, Mariani L, Stawski R, Watanabe T, De Girolami U,

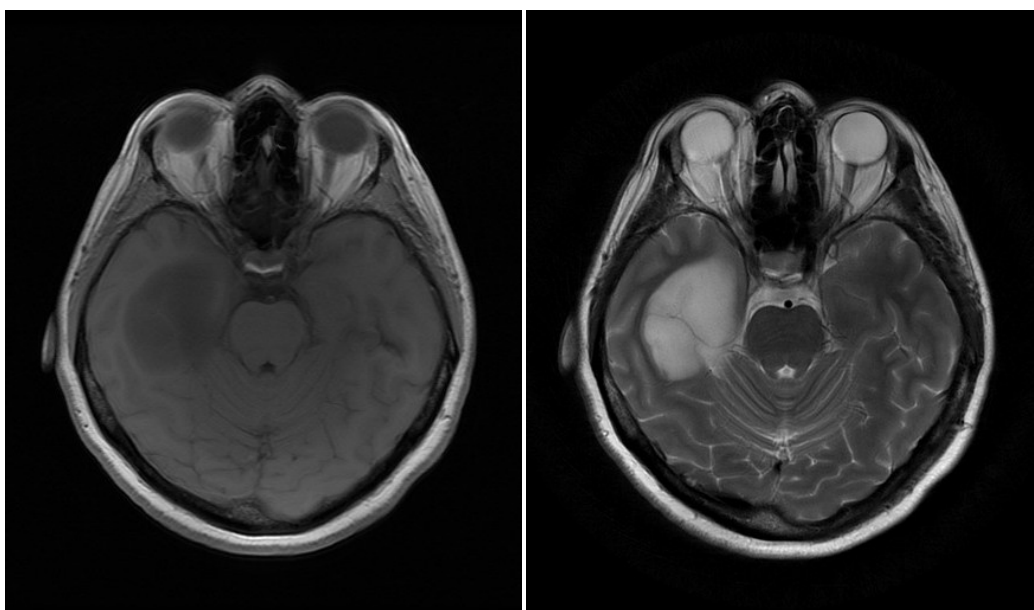
- Kleihues P, Ohgaki H. Molecular classification of low-grade diffuse gliomas. *Am J* . 2010 177:2708–2714.
56. Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ, Hatanpaa KJ, Rakheja D, Kovacs Z, Yang XL, Mashimo T, Raisanen JM, Marin-Valencia I, Pascual JM, Madden CJ, Mickey BE, Malloy CR, Bachoo RM, Maher EA. 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. *Nat Med*. 2012 Jan 26;18(4):624-9. doi: 10.1038/nm.2682.
 57. Lote K, Egeland T, Hager B, Stenwig B, Skullerud K, Berg-Johnsen J, Storm-Mathisen I, Hirschberg H. Survival, prognostic factors, and therapeutic efficacy in low-grade glioma: a retrospective study in 379 patients. *J Clin Oncol*. 1997 Sep;15(9):3129-40.
 58. Stupp R, Janzer RC, Hegi ME, Villemure JG, Mirimanoff RO. Prognostic factors for low-grade gliomas. *Semin Oncol*. 2003 Dec;30(6 Suppl 19):23-8. Review.
 59. Kramar F, Zemanova Z, Michalova K, Babicka L, Ransdorfova S, Hrabal P, Kozler P. Cytogenetic analyses in 81 patients with brain gliomas: correlation with clinical outcome and morphological data. *J Neurooncol*. 2007 Sep;84(2):201-11. Epub 2007 Jun 14.
 60. Kim YH, Lachuer J, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, Sure U, Wrede K, Nobusawa S, Nakazato Y, Tanaka Y, Vital A, Mariani L, Ohgaki H. Alterations in the RB1 pathway in low-grade diffuse gliomas lacking common genetic alterations. *Brain Pathol*. 2011 Nov;21(6):645-51. doi:10.1111/j.1750-3639.2011.00492.x. Epub 2011 May 30.
 61. Idbaih A, Carvalho Silva R, Crinière E, Marie Y, Carpentier C, Boisselier B, Taillibert S, Rousseau A, Mokhtari K, Ducray F, Thillet J, Sanson M, Hoang-Xuan K, Delattre JY. Genomic changes in progression of low-grade gliomas. *J Neurooncol*. 2008 Nov;90(2):133-40.
 62. Brat DJ, Seiferheld WF, Perry A, Hammond EH, Murray KJ, Schulsinger AR, Mehta MP, Curran WJ; Radiation Therapy Oncology Group. Analysis of 1p, 19q, 9p, and 10q as prognostic markers for high-grade astrocytomas using fluorescence *in-situ* hybridization on tissue microarrays from Radiation Therapy Oncology Group trials. *Neuro Oncol*. 2004 Apr;6(2):96-103.
 63. Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, Hirose T, Hirato J, Funada N, Fujimaki T, Hojo S, Kubo O, Ide T, Usui M, Ochiai C, Ito S, Takahashi H, Mukasa A, Asai A, Kirino T. Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res*. 2002 Jan;8(1):196-201.
 64. Wessels PH, Twijnstra A, Kessels AG, Krijne-Kubat B, Theunissen PH, Ummelen MI, Ramaekers FC, Hopman AH. Gain of chromosome 7, as detected by *in-situ* hybridization, strongly correlates with shorter survival in astrocytoma grade 2. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Mar;33(3):279-84.
 65. Schittenhelm J, Mittelbronn M, Meyermann R, Melms A, Tatagiba M, Capper D. Confirmation of R132H mutation of isocitrate dehydrogenase 1 as an independent prognostic factor in anaplastic astrocytoma. *Acta Neuropathol*. 2011 Nov;122(5):651-2. Epub 2011 Oct 8
 66. Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP. Dereglulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res* 2000; 60: 417-24.
 67. Solomon DA, Kim JS, Jenkins S, Ransom H, Huang M, Coppa N, Mabanta L, Bigner D, Yan H, Jean W, Waldman T. Identification of p18 INK4c as a tumor suppressor

- gene in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 2008 Apr 15;68(8):2564-9. Epub 2008 Apr 1.
68. Uhrbom L, Hesselager G, Nister M, Westermark B. Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus. *Cancer Res* 1998; 58: 5275-9.
 69. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 2010 Jan 19;17(1):98-110.
 70. Johnson DR, Ma DJ, Buckner JC, Hammack JE. Conditional probability of long-term survival in glioblastoma: A population-based analysis. *Cancer.* 2012 May 8. doi: 10.1002/cncr.27590. [Epub ahead of print]
 71. Thumma SR, Fairbanks RK, Lamoreaux WT, Mackay AR, Demakas JJ, Cooke BS, Elaimy AL, Hanson PW, Lee CM. Effect of pretreatment clinical factors on overall survival in glioblastoma multiforme: a Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) population analysis. *World J Surg Oncol.* 2012 May 3;10(1):75. [Epub ahead of print]
 72. Allahdini F, Amirjamshidi A, Reza-Zarei M, Abdollahi M. Evaluating the prognostic factors effective on the outcome of patients with glioblastoma multiformis: does maximal resection of the tumor lengthen the median survival? *World Neurosurg.* 2010 Feb;73(2):128-34; discussion e16. Epub 2009 Oct 21.
 73. Brennan C. Genomic profiles of glioma. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011 Jun;11(3):291-7. Review.
 74. Bralten LB, French PJ. Genetic Alterations in Glioma. *Cancers* 2011, 3, 1129-1140; doi:10.3390/cancers3011129.
 75. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Oct 7;90(19):1473-9.
 76. Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402, Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Mehta M, Curran W. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol.* 2006 Jun 20;24(18):2707-14.
 77. van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, van Kouwenhoven MC, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol.* 2006 Jun 20;24(18):2715-22.
 78. Zemanová Z, Kramar F, Babická L, Ransdorfová S, Melichercíková J, Hrabal P, Kozler P, Michalová K. Molecular cytogenetic stratification of recurrent oligodendrogliomas: utility of interphase fluorescence *in-situ* hybridization (I-FISH). *Folia Biol (Praha).* 2006;52(3):71-8.

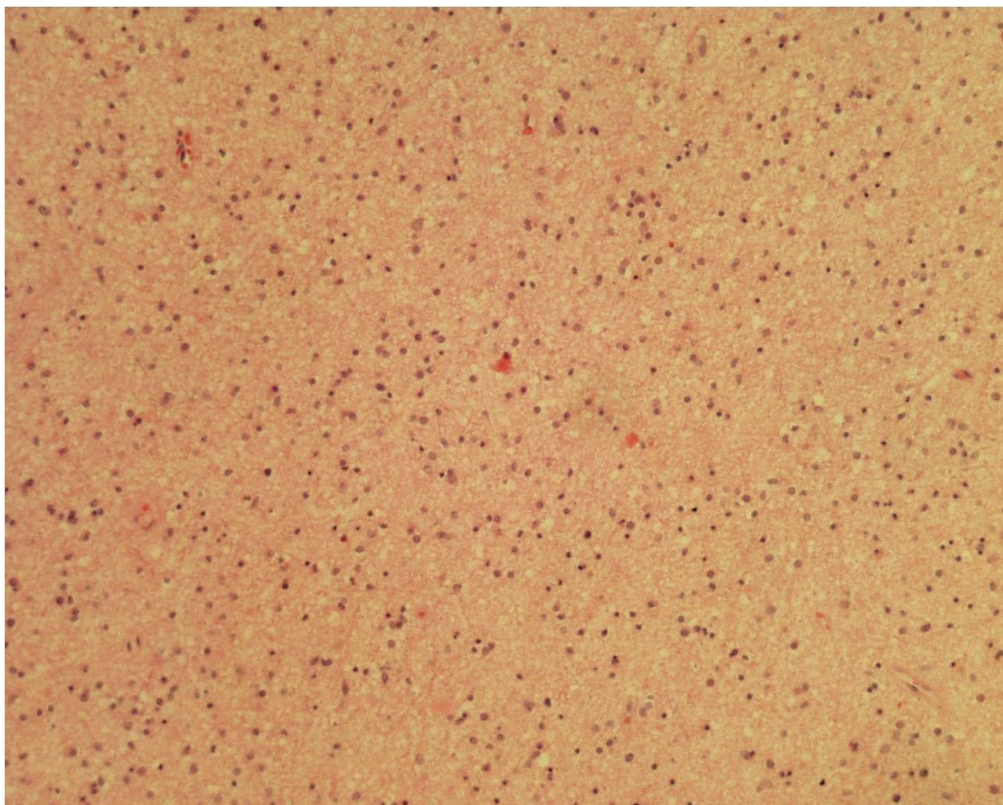
8. Obrazová příloha



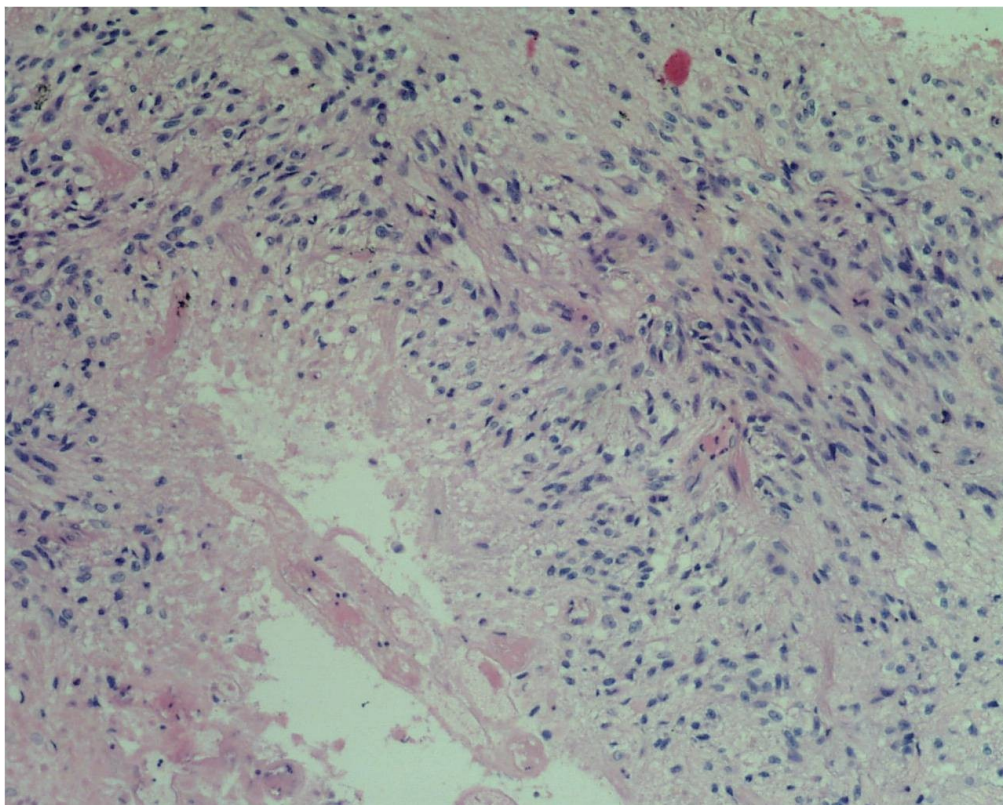
Obr. 1. Glioblastoma multifome, MRI vyšetření mozku, T1 a T2 vážený obraz



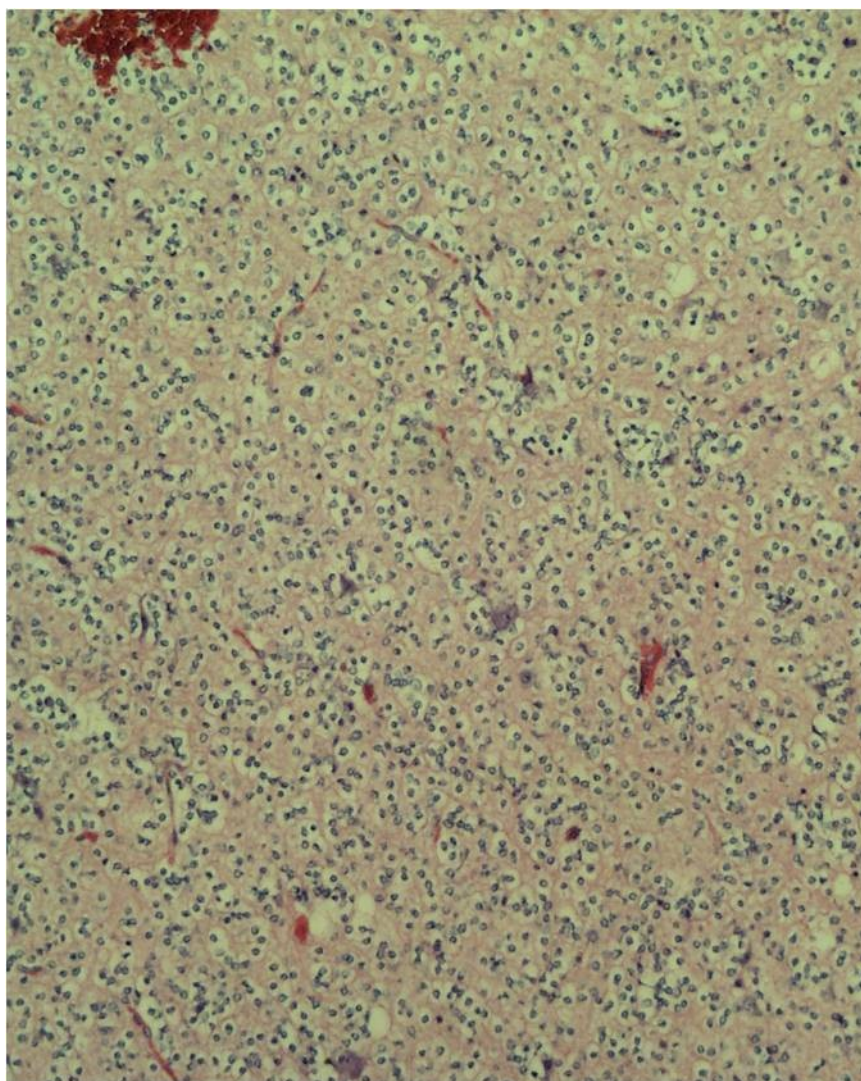
Obr. 2. Difuzní astrocytom, MRI vyšetření mozku, T1 a T2 vážený obraz



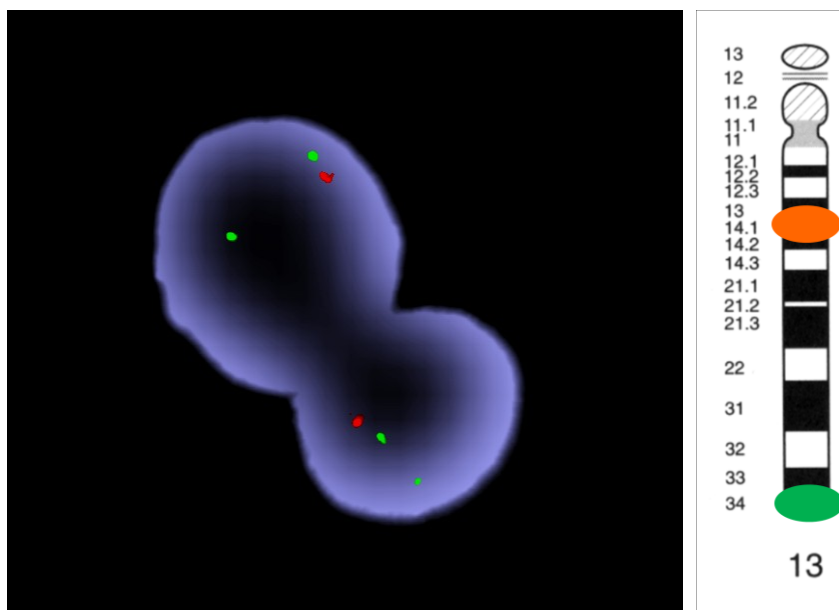
Obr. 3. Histologický obraz difuzního astrocytomu, barvení HE



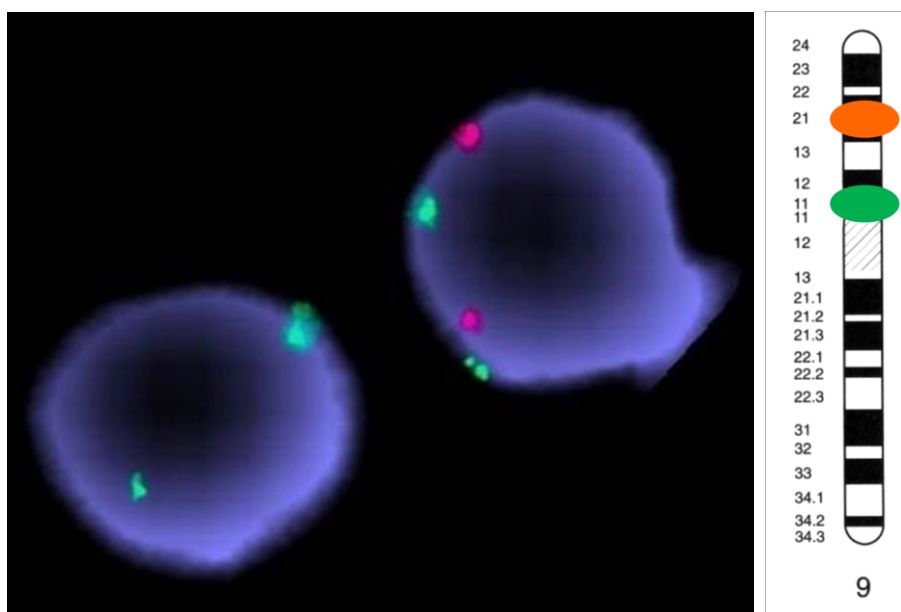
Obr. 4. Glioblastom, histologický obraz, barvení HE



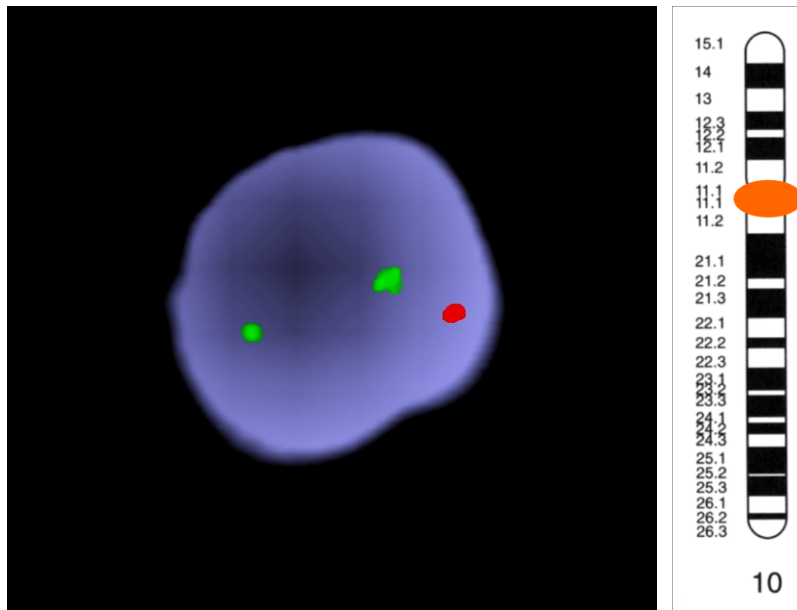
Obr. 5. Oligodendrogliom, histologický obraz, barvení HE



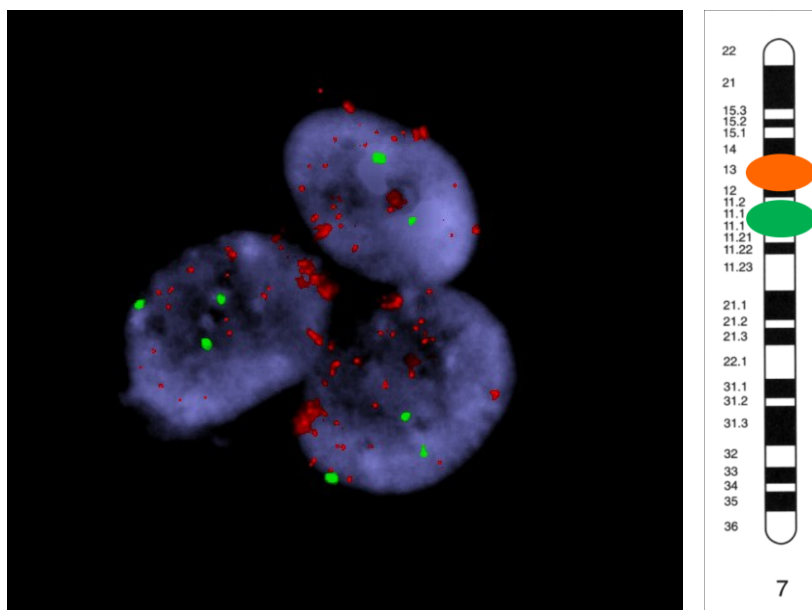
Obr. 6. Delece *RB1*



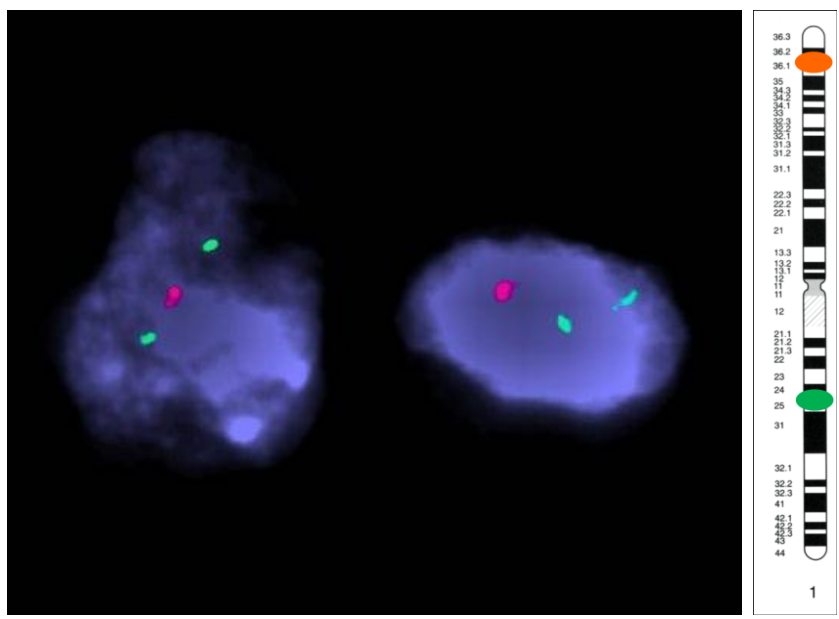
Obr. 7. Bialelická delece *CDKN2A*



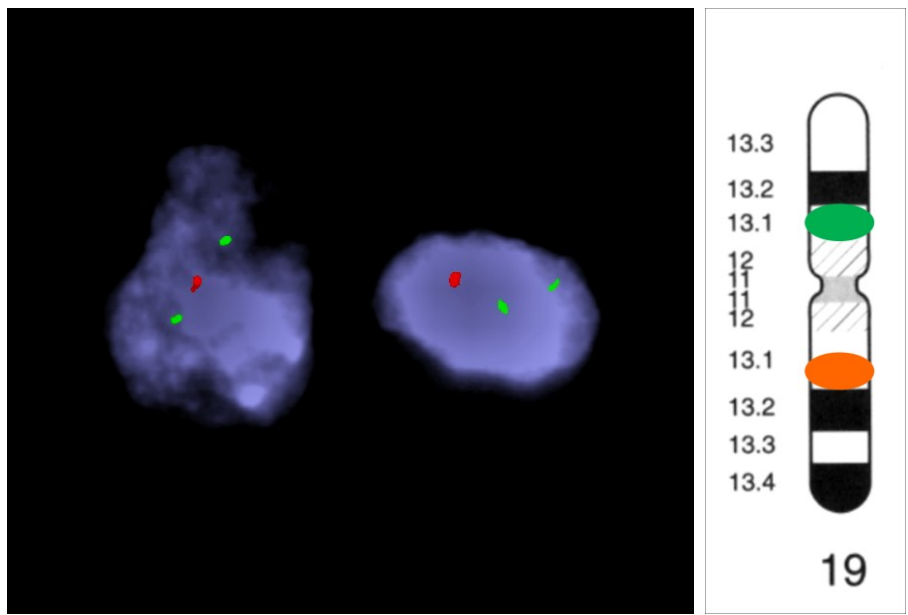
Obr. 8. Monosomie chromosomu 10



Obr. 9. Amplifikace *EGFR* (double minutes), trisomie chromosomu 7



Obr. 10. Delece 1p36



Obr. 11. Delece 19q13.3

Pilocytický astrocytom														
zdrojová data														
č. TK	Muž	žena	žije	věk při dg.	první příznak	věk při OP	KPS	OS od OP (MM)	celk. OS (MM)	lok	Ki-67	Nekroza	At. mitozy	Mikrovask. prolif
15	M		1	14,66	ložiskový nález	15,83	90	95,53	109,53	optikus	0,5	ne	ne	ne
38	M		1	35,27	ložiskový nález	35,49	90	91,87	94,53	IV. komora	0	ne	ne	ano
205	F		1	17,69	cefalea	17,79	100	71,37	72,57	mozeček	nd	ne	ne	ano
237	F		1	35,52	ložiskový nález	35,53	90	67,33	67,50	C4-7	1	ne	ne	ne
365	F		1	32,85	epi	34,86	100	49,33	73,43	FP dx	nd	ne	ne	ne
372	M		1	15,20	ložiskový nález	17,53	90	47,50	75,53	optikus	nd	ne	ne	ne
383	M		1	21,90	cefalea	21,96	90	44,47	45,20	mozeček	nd	ne	ne	ne

Tab. 25. Pohlaví: M - muž, F - žena; žije: 0 - pacient zemřel, 1 - pacient žije (k 31.3.2012); věk při dg.: v letech; KPS - Karnofsky skóre, resekce: B - biopsie, PR - parciální resekce, RR - radikální resekce; věk při OP: v letech; OS od OP: přežití od operace (v měsících), lok: lokalizace nádoru (F - frontálně, P - parietálně, T - temporálně, O - okcipitálně, CC - corpus callosum); Ki-67: prolif. index; nd - neprovedeno; Mikrovask. prolif: mikrovaskulární proliferace

Pilocytický astrocytom

zdrojová data

polyploidie		monosomie 10	
ano		ne	
ne		ne	
ano		ne	
ne		ne	
ano		ano	
nd		nd	
ne		ne	

Difuzní astrocytom zdrojová data														
č. TK	Muž žena	žije	věk při dg.	první příznak	KPS	resekce	věk při OP	OS od OP (MM)	celk. OS (MM)	lok	Ki-67	Nekroza	At. mitozy	Mikrovask. profil
9	F	1	26,88	epi	100	PR	26,93	96,53	97,17	F sin	1	ne	ne	ne
13	M	0	28,44	epi	90	PR	31,97	16,40	58,70	TP dx	0,5	ne	ne	ne
22	M	0	37,26	epi	100	RR	38,36	25,87	39,10	F sin	2	ne	ne	ne
26	M	0	34,14	epi	100	PR	37,03	58,97	93,57	FT sin	1	ne	ne	ne
28	F	0	39,98	epi	100	PR	50,96	84,23	215,97	TP sin	0,5	ne	ne	ne
29	M	1	36,24	epi	90	PR	39,24	93,50	129,53	F dx	1	ne	ne	ne
36	F	0	61,23	org. psychosyndrom	60	B	61,26	1,27	1,67	CC a F dx	1	ne	ne	ne
52	M	1	30,99	epi	100	RR	33,99	90,53	126,53	T dx	nd	ne	ne	ne
75	M	0	27,80	IC hypertenze	100	PR	28,12	55,93	59,70	T dx	1	ne	ne	ne
79	F	1	21,83	epi	100	PR	21,85	87,27	87,53	F dx	5	ne	ne	ne
85	M	1	29,50	epi	100	PR	29,52	86,33	86,60	F dx	nd	ne	ne	ne
87	M	0	25,93	epi	90	PR	29,55	11,73	55,13	FTP dx	0,5	ne	ne	ne
97	F	0	41,19	cefalea	90	RR	41,70	31,47	37,53	F sin	nd	ne	ne	ne
106	M	0	57,33	epi	90	PR	57,65	64,00	67,83	T dx	1	ne	ne	ne
122	F	0	53,11	epi	90	PR	59,11	18,23	90,23	FT sin	1	ne	ne	ne
125	F	0	30,28	epi	80	PR	34,25	6,37	54,00	FT sin	nd	ne	ne	ne
136	F	0	27,82	IC hypertenze	70	B	27,91	1,77	2,77	T dx	0,5	ne	ne	ne
153	F	0	24,25	cefalea	90	RR	24,78	59,53	65,87	F sin	1	ne	ne	ne
154	F	0	57,68	porucha paměti	90	B	58,15	0,70	6,33	FT sin	1	ne	ne	ne
160	M	0	28,34	epi	100	B	33,44	29,30	90,50	FTP dx	nd	ne	ne	ne
210	F	0	45,09	epi	100	PR	45,69	32,30	39,50	FT sin	nd	ne	ne	ne
217	M	1	36,64	epi	100	PR	38,54	69,83	92,57	F sin	nd	ne	ne	ne
219	M	0	43,20	epi	100	PR	43,28	65,90	66,80	F sin	1	ne	ne	ne
232	M	0	71,78	ložiskový nález	70	B	72,04	1,67	4,83	thalamus dx	nd	ne	ne	ne
236	F	1	50,77	epi	90	PR	58,94	67,47	165,53	T sin	1	ne	ne	ne
270	F	1	48,97	epi	90	B	49,32	62,30	66,53	F + CC	nd	ne	ne	ne
274	M	0	53,60	IC hypertenze	80	PR	53,66	1,40	2,10	TP dx	nd	ne	ne	ne
280	M	0	35,97	ložiskový nález	80	PR	40,06	9,50	58,53	pons	nd	ne	ne	ne
281	F	0	30,90	asympt	100	PR	31,23	17,97	21,97	TP dx	15	ne	ne	ne
282	M	0	57,99	org. psychosyndrom	80	PR	58,08	14,23	15,37	F sin	nd	ne	ne	ne
294	M	1	30,71	epi	100	RR	31,53	58,70	68,53	F sin	7	ne	ne	ne
295	M	1	31,63	epi	70	PR	35,58	58,47	105,87	F dx	nd	ne	ne	ne
310	M	1	29,68	epi	80	PR	29,71	56,50	56,83	FT dx	3	ne	ano	ne
319	M	0	30,90	ložiskový nález	80	PR	30,96	39,53	40,27	FTP dx	1	ne	ne	ne
362	M	1	30,46	epi	100	PR	33,32	49,60	83,83	P dx	nd	ne	ne	ne
373	M	1	29,34	epi	100	RR	30,11	47,23	56,53	F dx	nd	ne	ne	ne
382	M	1	15,02	epi	100	RR	18,94	44,57	91,53	F dx	1	ne	ne	ne
395	F	1	47,89	epi	100	RR	47,94	41,33	42,00	T dx	3	ne	ne	ne

Tab. 26. Pohlaví: M - muž, F - žena; žije: 0 - pacient zemřel, 1 - pacient žije (k 31.3.2012); věk při dg.: v letech; KPS - Karnofsky skóre; resekce: B - biopsie, PR - parciální resekce, RR - radikální resekce; věk při OP: v letech; OS od OP: přežití od operace (v měsících); lok: lokalizace nádoru (F - frontálně, P - parietálně, T - temporálně, O - okcipitálně, CC - corpus callosum); Ki-67: prolif. nd - neprovedeno; Mikrovask. prolif: mikrovaskulární proliferace; 0 - polyploidie, 1 - jiná aberace, 2 - bez aberace

Anaplastický astrocytom zdrojová data														
č. TK	Muž_žena	věk při dg.	žije	první příznak	KPS	resekce	věk při OP	OS od OP (MM)	celk. OS (MM)	lok	Ki-67	Nekroza	At. mitozy	Mikrovask. prolif
3	F	24,64	0	cefalea	80	RR	29,29	50,73	106,60	mozeček	nd	ano	ano	ano
5	F	54,74	0	epi	90	B	54,97	0,80	3,57	FT sin	nd	ne	ano	ne
32	M	28,28	0	epi	80	PR	31,26	3,60	39,37	FP dx	nd	ne	ano	ne
41	M	26,39	0	epi	90	PR	29,66	41,97	81,30	F sin	nd	ne	ne	ano
51	F	35,06	0	epi	90	PR	43,30	43,30	142,27	F dx	nd	ne	ano	ano
55	M	68,72	0	ložiskový nález	90	PR	68,78	12,63	13,37	T sin	nd	ne	ano	ne
57	F	33,92	0	IC hypertenze	90	PR	34,23	22,67	26,43	P sin	nd	ne	ano	ano
73	F	66,82	0	ložiskový nález	70	PR	66,98	1,40	3,27	T sin	nd	ne	ano	ano
83	M	55,41	0	ložiskový nález	70	PR	55,45	1,10	1,50	P sin	nd	ne	ano	ne
94	M	27,83	1	epi	90	PR	27,98	85,67	87,53	T sin	nd	ne	ano	ano
104	M	30,93	0	epi	80	PR	31,09	11,80	13,70	P sin	1	ne	ano	ano
105	F	30,84	1	epi	90	RR	30,85	84,30	84,43	F dx.	10	ne	ano	ne
118	F	58,27	0	epi	80	PR	58,28	13,00	13,07	F sin	nd	ne	ano	ano
120	F	66,74	0	cefalea	80	PR	66,84	11,00	12,13	TPO dx	nd	ne	ano	ne
138	M	45,99	0	ložiskový nález	80	PR	46,13	4,37	6,03	FT sin	nd	ne	ano	ne
184	M	55,69	0	org. psychosyndrom	70	B	56,02	2,17	6,13	O sin a CC	nd	ne	ano	ne
197	F	38,20	0	jiné	70	B	38,30	5,47	6,43	thalamus dx	nd	ne	ano	ne
231	F	66,02	0	ložiskový nález	70	RR	66,11	12,93	14,00	F sin	45	ne	ano	ne
263	M	39,89	0	cefalea	90	PR	43,61	7,30	51,90	F dx a CC	nd	ne	ano	ne
275	F	39,98	0	epi	90	PR	53,63	52,23	215,97	T sin	nd	ne	ne	ano
301	M	64,24	0	org. psychosyndrom	70	B	64,32	0,57	1,50	hypothalamus	nd	ne	ne	ano
320	F	31,19	0	epi	90	PR	34,38	28,03	66,23	T sin	20	ne	ano	ne
341	M	57,21	0	epi	90	PR	58,84	9,83	29,30	T sin	15	ne	ne	ne
347	M	64,31	0	ložiskový nález	90	RR	64,48	8,77	10,83	T dx	25	ne	ano	ne
349	M	28,23	1	epi	100	PR	28,93	52,07	60,53	FT dx	10	ne	ne	ne
359	M	50,42	1	epi	100	PR	51,39	49,87	61,53	P sin	nd	ne	ano	ne
398	M	27,85	0	epi	100	PR	35,46	31,53	122,80	F sin	15	ne	ano	ne

Tab. 27. Pohlaví: M - muž, F - žena; žije: 0 - pacient zemřel, 1 - pacient žije (k 31.3.2012); věk při dg.: v letech; KPS - Karnofsky skóre, resekce: B - biopsie, PR - parciální resekce, RR - radikální resekce; věk při OP: v letech; OS od OP: přežití od operace (v měsících), lok: lokalizace nádoru (F - frontálně, P - parietálně, T - temporálně, O - okcipitálně, CC - corpus callosum); Ki-67: prolif. index; nd - neprovedeno; Mikrovask. prolif: mikrovaskulární proliferace; 0 - ne, 1 - ano

[illegible]

Glioblastom zdrojová data														
č. TK	Muž žena	žije	věk při dg.	první příznak	KPS	resekce	věk při OP	OS od OP (MM)	celk. OS (MM)	lok	Ki-67	Nekroza	At. mitozy	Mikrovask. prolif
12	M	0	49,80	ložiskový nález	100	PR	49,99	14,67	16,93	FT dx	nd	ano	ano	ano
17	M	0	79,56	ložiskový nález	80	PR	79,66	5,13	6,33	T dx	nd	ano	ano	ano
20	M	0	55,66	epi	90	PR	56,00	11,33	15,33	F sin	2	ano	ano	ano
33	M	0	44,69	epi	90	PR	45,10	27,93	32,83	FT sin	nd	ano	ano	ano
39	F	0	75,59	IC hypertenze	80	PR	75,61	0,67	0,90	F sin	nd	ano	ano	ano
42	M	0	58,83	epi	100	PR	59,07	9,43	12,37	O dx	nd	ano	ano	ano
47	M	0	45,89	epi	90	RR	46,35	18,73	24,23	T dx	30	ano	ano	ano
49	F	0	68,71	ložiskový nález	70	B	68,77	3,07	3,77	P dx	nd	ano	ano	ano
50	F	0	40,21	cefalea	90	RR	40,23	15,60	15,83	P sin	10	ano	ne	ano
53	F	0	73,81	org. psychosyndrom	80	PR	73,98	3,07	5,07	FTP sin	nd	ne	ne	ne
56	M	0	63,54	ložiskový nález	80	RR	63,66	13,20	14,67	T sin	nd	ano	ano	ano
58	M	0	73,99	ložiskový nález	80	PR	74,07	3,23	4,10	PO sin	nd	ano	ano	ano
62	F	0	65,24	cefalea	80	PR	65,29	18,40	19,10	F dx	nd	ano	ano	ano
68	F	0	65,71	org. psychosyndrom	80	PR	65,82	1,67	3,00	O dx a CC	nd	ano	ano	ne
71	F	0	58,10	ložiskový nález	90	RR	58,20	6,80	7,97	BGG dx	nd	ano	ne	ne
72	M	0	59,90	ložiskový nález	90	B	59,99	2,50	3,57	TP dx	nd	ano	ne	ano
74	F	0	61,54	cefalea	70	B	61,80	2,73	5,83	CC	nd	ano	ne	ano
76	M	0	61,11	epi	70	PR	61,29	4,13	6,20	F sin	25	ano	ano	ano
77	F	0	58,09	cefalea	90	PR	58,12	6,27	6,63	F dx	40	ano	ano	ano
80	M	0	65,21	cefalea	90	PR	65,26	6,93	7,53	T dx	40	ano	ano	ano
81	F	0	59,25	ložiskový nález	60	B	59,33	1,13	2,10	CC	12	ano	ne	ne
82	M	0	66,35	org. psychosyndrom	80	PR	66,38	10,67	11,00	F sin	20	ano	ano	ano
88	M	0	63,60	ložiskový nález	50	PR	63,67	0,30	1,17	T dx	nd	ano	ano	ne
89	M	0	69,27	ložiskový nález	100	PR	69,48	7,57	10,13	F dx	15	ano	ano	ano
91	M	0	59,91	cefalea	80	PR	59,93	17,80	18,00	O dx	nd	ano	ano	ano
92	F	0	52,68	epi	100	PR	52,75	2,67	3,53	O sin	nd	ano	ano	ano
96	M	0	65,65	ložiskový nález	80	B	65,82	7,83	9,87	P sin	nd	ano	ano	ano
98	M	0	71,78	cefalea	90	PR	71,87	14,07	15,20	F dx	nd	ano	ano	ano
100	M	0	51,78	epi	100	RR	51,84	40,87	41,60	T dx	nd	ano	ano	ano
103	M	0	48,25	ložiskový nález	80	B	48,34	3,83	4,93	F dx	nd	ano	ano	ano
107	F	0	48,61	epi	100	PR	48,68	43,77	44,57	T sin	nd	ano	ano	ano
111	M	0	52,59	ložiskový nález	80	PR	52,84	11,10	14,13	F sin	30	ano	ano	ano
113	M	0	58,47	ložiskový nález	90	PR	58,56	6,17	7,17	P sin	nd	ano	ano	ano
121	M	0	67,69	org. psychosyndrom	80	PR	67,86	14,97	17,00	F sin	nd	ano	ano	ano
123	M	0	54,65	epi	90	PR	55,25	2,23	9,43	T sin	nd	ano	ano	ano
124	F	0	83,94	ložiskový nález	90	B	83,96	3,47	3,77	F dx	8	ano	ano	ano
126	M	0	72,76	epi	90	PR	73,06	6,80	10,40	T dx	nd	ano	ano	ano

[illegible]

Glioblastom zdrojová data												
127	M	0	72,53	org. psychosyndrom	60	PR	72,71	4,13	6,30	P sin	nd	ano
130	M	0	67,39	org. psychosyndrom	60	B	67,41	0,93	1,20	F dx a CC	nd	ano
132	M	0	66,97	epi	80	B	67,03	1,97	2,63	CC	nd	ano
134	M	0	50,67	epi	60	PR	51,69	2,70	14,93	T sin	nd	ano
135	M	0	67,29	epi	80	PR	67,30	4,60	4,70	O sin	nd	ne
139	M	0	46,43	cefalea	100	PR	46,51	15,93	16,90	F dx	nd	ano
140	M	0	55,56	cefalea	90	RR	55,61	11,30	11,90	T dx	nd	ano
141	F	0	56,44	epi	90	RR	57,30	56,33	66,70	FT sin	25	ano
142	F	0	55,10	epi	100	RR	55,15	13,67	14,27	T dx	nd	ano
143	M	0	41,16	cefalea	60	PR	41,23	0,03	0,93	T dx	nd	ano
144	M	0	54,68	ložiskový nález	90	PR	54,78	1,03	2,20	F sin	nd	ano
146	M	0	67,33	org. psychosyndrom	90	PR	67,36	10,90	11,27	F sin	nd	ano
147	M	0	53,17	porucha paměti	80	PR	53,35	1,60	3,73	CC	nd	ano
156	M	0	59,27	cefalea	90	PR	59,34	2,73	3,53	TO dx	nd	ano
158	M	0	57,74	ložiskový nález	90	PR	57,86	10,40	11,83	F dx	nd	ano
163	F	0	75,70	ložiskový nález	80	PR	75,84	4,53	6,23	P sin	nd	ano
166	M	0	47,84	cefalea	80	PR	47,90	17,80	18,47	F dx	nd	ano
172	M	0	70,47	org. psychosyndrom	70	PR	70,94	1,57	7,20	TP dx	nd	ano
173	F	0	37,99	cefalea	80	B	38,57	6,50	13,50	P sin	nd	ano
175	M	0	45,22	epi	70	PR	48,59	3,40	43,93	F dx.	15	ne
176	M	0	34,87	ložiskový nález	90	PR	34,94	19,53	20,30	T sin	nd	ano
177	F	0	54,82	org. psychosyndrom	70	RR	54,86	3,73	4,20	F dx.	nd	ano
181	F	0	58,54	cefalea	80	PR	58,59	6,23	6,77	T dx	nd	ano
182	M	0	63,06	epi	80	PR	63,07	4,60	4,77	P sin	nd	ano
189	F	0	61,84	ložiskový nález	90	PR	62,03	3,67	5,87	TP dx	nd	ano
199	M	0	65,13	ložiskový nález	90	PR	65,23	0,63	1,83	PO sin	nd	ano
201	F	0	60,21	porucha paměti	90	RR	60,31	58,43	59,70	TP dx	nd	ano
203	F	0	67,85	ložiskový nález	60	B	67,95	3,07	4,27	TPO dx	nd	ano
208	F	0	73,15	cefalea	50	PR	73,22	0,17	1,03	PO dx	nd	ano
212	M	0	73,11	ložiskový nález	80	PR	72,19	14,17	3,07	PO sin	nd	ano
213	M	0	64,70	cefalea	80	PR	64,74	1,57	2,07	T dx	45	ano
215	F	0	58,09	porucha paměti	80	PR	58,19	19,20	20,27	T sin	45	ano
216	F	0	57,89	epi	90	PR	58,27	3,50	8,07	FT dx	nd	ano
220	M	0	63,53	ložiskový nález	90	RR	63,70	5,47	7,57	T dx	nd	ano
221	M	0	76,85	epi	80	PR	76,94	2,77	3,83	TO dx	20	ano
222	M	0	59,87	porucha paměti	90	PR	60,00	4,30	5,83	PO sin	nd	ano
224	F	0	82,35	ložiskový nález	60	B	82,78	0,53	5,67	T sin	nd	ano
226	F	0	56,39	cefalea	70	PR	56,57	9,30	11,40	T dx	nd	ano

Glioblastom zdrojová data													
229	F	0	33,87	epi	80	RR	38,30	15,93	69,10	F sin	40	ano	ano
238	F	0	72,64	org. psychosyndrom	50	RR	72,66	0,57	0,90	F sin	nd	ano	ano
240	F	0	54,27	org. psychosyndrom	80	RR	54,28	8,03	8,17	F sin	nd	ano	ano
244	M	0	69,06	org. psychosyndrom	60	PR	69,10	1,00	1,43	FT dx	nd	ano	ano
246	M	0	72,72	jiné	90	PR	72,91	4,90	7,17	FT dx	nd	ano	ano
247	M	0	55,70	ložiskový nález	80	B	55,89	14,63	17,00	F dx	nd	ano	ano
259	M	0	47,97	org. psychosyndrom	90	RR	48,00	23,27	23,60	F sin	nd	ano	ano
261	F	0	55,14	ložiskový nález	90	RR	55,16	15,37	15,60	P sin	nd	ano	ano
262	F	0	65,63	cefalea	70	PR	65,74	0,93	2,30	T dx	nd	ano	ano
271	M	0	64,64	ložiskový nález	80	PR	64,73	6,47	7,50	TP sin	nd	ano	ano
272	M	0	56,96	cefalea	90	PR	57,47	2,67	8,77	PO dx	nd	ano	ne
276	F	0	62,60	ložiskový nález	80	PR	62,68	2,37	3,30	FT sin	nd	ano	ano
278	F	0	51,44	epi	100	PR	51,64	38,17	40,50	P sin	15	ne	ano
283	F	0	48,90	ložiskový nález	90	RR	49,01	10,83	12,13	P sin	nd	ano	ano
284	F	0	64,70	ložiskový nález	90	RR	64,75	6,57	7,13	TP dx	20	ano	ano
286	M	0	69,65	epi	90	PR	69,70	16,93	17,53	P dx	nd	ano	ano
287	M	0	58,34	cefalea	80	PR	58,43	24,80	25,90	FTP dx	nd	ano	ne
290	F	1	27,33	epi	100	RR	32,43	59,23	120,53	F dx	nd	ano	ano
292	M	0	62,39	epi	100	RR	62,75	12,10	16,40	P sin	nd	ano	ano
296	M	1	26,45	epi	100	RR	26,78	58,43	62,43	T sin	nd	ano	ano
298	F	0	52,13	epi	80	RR	55,78	13,60	57,33	T dx	nd	ne	ne
299	M	0	58,62	ložiskový nález	60	PR	61,40	0,63	34,00	O sin	nd	ano	ano
300	M	0	51,26	ložiskový nález	90	RR	51,29	19,63	20,03	T dx	nd	ano	ano
309	M	0	43,08	cefalea	80	B	43,11	1,93	2,30	CC	nd	ano	ano
312	F	0	73,88	porucha paměti	60	PR	74,05	1,67	3,73	T dx	nd	ano	ano
317	M	0	66,07	cefalea	90	PR	66,27	1,10	3,43	T sin	nd	ano	ano
318	F	0	32,28	epi	80	RR	32,32	5,63	6,07	FP sin	20	ano	ano
321	M	0	52,20	ložiskový nález	80	PR	52,63	17,73	22,97	F dx	nd	ano	ano
331	M	0	77,27	epi	80	PR	77,54	3,13	6,30	T dx	nd	ano	ano
333	F	0	61,51	epi	90	PR	61,63	9,40	10,87	T dx.	2	ne	ne
334	F	1	34,42	jiné	100	PR	34,62	54,17	56,53	F dx	25	ano	ano
337	M	0	63,47	ložiskový nález	70	PR	63,54	11,27	12,10	PO sin	nd	ano	ano
338	M	0	65,51	ložiskový nález	60	PR	65,53	5,60	5,90	F sin	nd	ano	ano
340	M	0	61,74	epi	80	PR	61,84	7,23	8,40	F dx	nd	ano	ano
346	M	0	62,99	cefalea	80	PR	63,08	1,17	2,33	FT dx	nd	ano	ano
348	M	0	58,69	ložiskový nález	90	PR	58,73	9,13	9,60	FT sin	40	ano	ano
350	M	0	55,76	org. psychosyndrom	90	B	55,77	0,70	0,83	F dx	nd	ano	ano
351	F	0	58,84	epi	90	PR	58,89	3,67	4,20	P dx	15	ano	ano

Glioblastom zdrojová data														
352	M	0	38,13	epi	90	RR	38,15	18,20	18,47	F sin	25	ano	ano	ano
354	F	0	64,51	ložiskový nález	90	PR	64,56	7,97	8,57	P sin	20	ano	ne	ano
355	M	0	71,29	ložiskový nález	70	B	71,34	0,00	0,60	TP dx	nd	ano	ano	ano
356	F	0	66,04	org. psychosyndrom	80	PR	66,20	10,80	12,77	F dx	40	ano	ano	ano
358	M	0	58,67	cefalea	80	PR	58,71	2,13	2,67	T dx	nd	ano	ano	ano
360	F	0	65,42	cefalea	80	B	65,65	2,07	4,83	PO dx a CC	nd	ano	ano	ano
363	M	0	53,67	ložiskový nález	80	B	53,73	3,57	4,33	F sin	15	ano	ano	ano
366	M	0	44,41	epi	100	PR	44,42	22,67	22,83	P dx	nd	ano	ano	ano
369	F	0	57,66	porucha paměti	100	RR	57,75	28,97	30,10	PO dx	nd	ano	ano	ano
370	F	0	68,95	org. psychosyndrom	90	RR	69,05	0,67	1,87	T dx	8	ano	ano	ano
371	F	0	54,67	ložiskový nález	90	PR	54,73	11,17	11,80	F dx	nd	ano	ano	ano
375	F	0	43,01	IC hypertenze	20	PR	43,02	0,33	0,50	F a CC	nd	ano	ano	ano
376	F	0	72,43	cefalea	100	PR	72,68	5,90	8,83	T dx	nd	ano	ne	ne
379	F	0	70,13	ložiskový nález	90	RR	70,28	12,77	14,57	O sin	nd	ano	ano	ano
384	M	0	59,61	epi	100	PR	59,84	11,50	14,23	T dx	nd	ano	ano	ano
385	F	0	55,56	org. psychosyndrom	80	B	55,59	2,60	2,90	F sin	25	ano	ano	ano
386	M	0	56,15	cefalea	100	RR	56,23	16,53	17,50	T dx	nd	ano	ano	ano
387	M	0	52,44	epi	90	B	52,51	3,33	4,20	P sin	30	ano	ano	ano
388	F	0	42,89	ložiskový nález	90	RR	43,08	10,53	12,80	FP sin	30	ano	ano	ano
389	M	0	64,04	epi	80	RR	64,05	9,87	10,07	F dx	15	ano	ano	ano
390	F	1	50,73	epi	90	RR	50,82	40,87	42,00	F dx	20	ano	ano	ano
393	F	0	65,69	org. psychosyndrom	60	PR	65,75	2,80	3,57	F sin	nd	ano	ano	ano
394	F	0	76,55	jiné	100	RR	76,68	6,00	7,53	T sin	30	ano	ano	ano
400	M	0	48,82	epi	70	RR	52,78	18,33	65,87	P sin	15	ano	ano	ano
407	M	0	45,13	epi	100	PR	45,17	7,60	8,07	F sin a CC	nd	ano	ano	ano
409	M	0	43,16	porucha paměti	90	RR	43,44	33,30	36,73	F sin	nd	ano	ano	ano
412	F	0	64,70	epi	80	B	64,98	0,70	4,07	TP sin	15	ne	ano	ano
413	F	0	74,46	ložiskový nález	90	B	74,52	2,20	2,97	F dx	nd	ano	ne	ano
420	M	0	61,81	ložiskový nález	90	RR	61,87	12,10	12,83	O dx	40	ano	ano	ano
423	F	1	28,09	epi	100	RR	28,15	31,17	31,87	F sin	25	ano	ano	ano
424	M	0	45,53	epi	100	PR	45,73	16,90	19,40	P dx	nd	ano	ano	ano
426	F	0	39,54	ložiskový nález	90	PR	39,63	26,30	27,47	P sin	nd	ano	ano	ano

Tab. 28. Pohlaví: M - muž, F - žena; žije: 0 - pacient zemřel, 1 - pacient žije (k 31.3.2012); věk při dg.: v letech; KPS - Karnofsky skóre, resekce: B - biopsie, PR - parciální resekce, RR - radikální resekce; věk při OP: v letech; OS od OP: přežití od operace (v měsících), lok: lokalizace nádoru (F - frontálně, P - parietálně, T - temporálně, O - okcipitálně, CC - corpus callosum, BGG - basální ganglia); Ki-67: prolif. index; nd - neprovedeno; Mikrovask. prolif: mikrovaskulární proliferace; 0 - ne, 1 - ano; jiné/neg: 0 - polyploidie, 1 - jiná aberace, 2 - neg. nález

[illegible]

Oligodendrogliom zdrojová data														
č. TK	Muž žena	žije	věk při dg.	první příznak	KPS	resekce	věk při OP	OS od OP (MM)	celk. OS (MM)	lok	Ki-67	Nekroza	At. mitozy	Mikrovask. prolif
4	F	0	55,71	epi	80	PR	56,84	8,93	22,53	F dx	1	ne	ne	ne
27	M	0	23,41	ložiskový nález	90	RR	26,56	51,10	88,83	F dx	5	ne	ne	ne
145	F	1	31,33	epi	100	RR	37,50	77,60	151,60	F sin	5	ne	ne	ne
169	F	1	53,53	ložiskový nález	90	PR	57,63	75,63	124,87	F sin	nd	ne	ne	ne
171	M	1	29,58	epi	90	RR	29,64	75,33	76,00	F dx	nd	ne	ne	ne
191	F	0	34,70	epi	80	B	42,57	0,07	94,57	T dx	nd	ne	ne	ne
195	M	0	40,78	epi	100	PR	53,56	3,53	157,00	F dx	15	ne	ne	ne
198	M	1	43,15	epi	100	PR	50,95	71,87	165,53	T dx	8	ne	ano	ne
243	M	0	67,42	epi	80	PR	72,93	1,63	67,77	F sin	0,5	ne	ne	ne
255	F	1	57,71	jiné	100	RR	57,74	64,60	65,00	F dx	nd	ne	ne	ne
285	M	1	36,61	epi	100	PR	39,53	59,50	94,53	T dx.	3	ne	ne	ne
314	F	0	39,43	epi	80	RR	41,63	26,63	52,97	F sin	nd	ne	ne	ne
322	M	0	33,29	epi	80	B	41,48	45,23	143,50	F dx	15	ne	ne	ne
378	F	1	41,42	cefalea	90	RR	42,62	45,70	60,07	F sin	2	ne	ne	ne
392	F	1	51,56	cefalea	100	PR	51,59	42,20	42,53	F dx	5	ne	ne	ne
396	F	1	51,68	epi	100	PR	60,74	41,33	150,10	T dx	nd	ne	ne	ne
401	M	1	50,79	epi	90	PR	50,91	40,60	42,00	PO sin	2	ne	ne	ne
440	M	1	30,72	epi	100	B	31,64	26,57	37,53	FT sin	nd	ne	ne	ne

Tab. 29. Pohlaví: M - muž, F - žena; žije: 0 - pacient zemřel, 1 - pacient žije (k 31.3.2012); věk při dg.: v letech; KPS - Karnofsky skóre, resekce: B - biopsie, PR - parciální resekce, RR - radikální resekce; věk při OP: v letech; OS od OP: přežití od operace (v měsících), lok: lokalizace nádoru (F - frontálně, P - parietálně, T - temporálně, O - okcipitálně, CC - corpus callosum); Ki-67: prolif. index; nd - neprovedeno; Mikrovask. prolif: mikrovaskulární proliferace; 0 - ne, 1 - ano

Oligodendrogliom zdrojová data									
polyploidie	monosomie 10	amplifikace EGFR	delece(p16)	delece(FB1)	trisomie 7	delece 1p	delece 19q	monosomie 17	1p/19q
ano	ne	ano	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1
ano	ano	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1
ano	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1
ano	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	ne	1
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	0
ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	0
ano	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1

Anaplastický oligoendrogliom zdrojová data														
č. TK	Pohlaví	žije	věk při dg.	první příznak	KPS	resekce	věk při OP	OS od OP (MM)	celk. OS (MM)	lok	Ki-67	Nekroza	At. mitozy	Mikrovask. profil
6	M	0	35,77	IC hypertenze	100	RR	40,33	83,90	138,70	F sin	ložisk. vysoká	ne	ano	ne
37	F	0	54,41	cefalea	90	PR	54,48	15,77	16,67	F sin	nd	ano	ano	ano
64	M	0	36,89	cefalea	90	RR	38,64	38,27	59,17	P sin	20	ne	ne	ne
67	F	0	38,04	IC hypertenze	100	PR	38,28	74,10	76,97	F dx a CC	nd	ne	ano	ano
101	M	0	58,31	ložiskový nález	100	PR	58,83	36,47	42,67	P dx	nd	ne	ano	ano
128	F	1	51,60	epi	100	RR	52,59	80,57	92,53	TP dx	6	ne	ano	ne
150	M	0	23,41	ložiskový nález	90	PR	27,92	34,70	88,83	F dx	nd	ano	ano	ano
168	F	0	62,12	org. psychosyndrom	70	PR	62,17	25,93	26,50	F dx	20	ne	ne	ano
174	F	0	61,84	ložiskový nález	70	PR	61,92	4,97	5,87	T dx	nd	ano	ano	ano
179	M	1	30,73	epi	90	RR	41,02	74,13	197,53	F sin	nd	ano	ano	ano
186	F	1	34,27	epi	90	PR	36,71	73,47	102,83	FT dx	10	ano	ano	ano
188	M	0	45,56	epi	100	PR	51,24	12,43	80,60	FT sin	15	ano	ne	ne
211	M	0	57,38	epi	90	PR	57,42	34,17	34,70	F sin	10	ne	ne	ne
218	M	1	56,64	ložiskový nález	90	RR	56,74	69,83	71,00	PO dx	nd	ne	ano	ano
225	M	0	55,41	ložiskový nález	90	PR	58,36	24,53	59,93	TO dx	nd	ne	ano	ne
242	M	1	32,68	epi	90	PR	40,80	57,10	153,80	FP dx	4	ano	ano	ano
265	F	0	57,40	org. psychosyndrom	70	PR	57,50	31,13	32,33	F sin	9	ano	ano	ano
339	F	1	28,38	epi	100	PR	32,16	53,67	99,07	F dx	5	ne	ano	ne
374	M	0	67,16	epi	80	PR	67,69	3,43	9,73	O sin	nd	ano	ano	ano
377	F	0	53,93	epi	90	PR	53,94	29,07	29,23	F sin	25	ne	ano	ne
391	M	0	58,71	porucha paměti	70	PR	59,08	20,67	25,13	FT sin	nd	ano	ano	ano
439	M	0	31,64	epi	90	RR	42,18	11,47	137,93	T sin	nd	ano	ano	ano
444	M	1	41,08	epi	100	RR	45,68	26,30	81,53	TP dx	nd	ano	ano	ano
449	M	1	27,98	epi	100	PR	35,55	24,93	115,80	FT sin	nd	ne	ano	ne
451	F	1	49,14	epi	100	RR	50,99	24,70	47,00	F dx	15	ne	ano	ne
454	F	1	23,71	IC hypertenze	90	PR	23,76	23,63	24,30	F dx	10	ano	ne	ano

Tab 30. Pohlaví: M - muž, F - žena; žije: 0 - pacient zemřel, 1 - pacient žije (k 31.3.2012); věk při dg.: v letech; KPS - Karnofsky skóre, resekce: B - biopsie, PR - parciální resekce, RR - radikální resekce; věk při OP: v letech; OS od OP: přežití od operace (v měsících), lok: lokalizace nádoru (F - frontálně, P - parietálně, T - temporálně, O - okcipitálně, CC - corpus callosum); Ki-67: profil: index; nd - neprovedeno; Mikrovask. profil: mikrovaskulární proliferace; 0 - ne, 1 - ano; 1p_19q_jiné: 0 - pouze delece 1p/19q, 1 - delece 1p/19q + jiné chromosomové aberace, 2 - bez delece 1p/19q

Anaplastický oligoendrogliom zdrojová data												
polyploidie	monosomie 10	amplifikace EGFR	delece(p16)	delece(RB1)	trisomie 7	delece 1p	délece 19q	monosomie 9	1p/19q	polyploidie	jiná	1p_19q_jiná
ne	ne	ne	ano	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	1	1
ne	ano	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	1	1
ano	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1	1	0	1
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	0	0	0	2
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	0	0	0	2
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	0	0	0	2
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1	0	0	0
ano	ne	ne	ano	ne	ne	ano	ano	ne	1	0	0	0
ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	0	1	0	2
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	1	1	1	1
ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	0	1	0	2
ne	ne	ne	ano	ne	ne	ano	ano	ne	1	0	1	1
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	0	0	0	2
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ne	0	0	0	2
ne	ne	ne	ano	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	1	1
ano	ne	ne	ne	ne	ano	ne	ne	ne	0	1	1	2
ano	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	1	0	1
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano	ano	ano	1	0	0	0
ne	ne	ne										

Anaplastický oligoastrocytom														
zdrojová data														
č. TK	Muž	žena	žije	věk při dg.	první příznak	KPS	věk při OP	OS od OP (MM)	celk. OS (MM)	lok	Ki-67	Nekroza	At. mitozy	Mikrovask. profil
108	F		1	24,46	epi	100	29,08	84,00	139,47	F sin	nd	ne	ano	ne
133	F		0	39,47	ložiskový nález	100	39,56	62,30	63,43	F sin	5	ne	ano	ano
183	M		0	30,93	epi	70	31,97	1,23	13,70	P sin	nd	ne	ano	ano
288	M		0	68,67	org. psychosyndrom	70	69,09	2,37	7,50	P dx	nd	ano	ano	ano
291	M		0	27,28	epi	100	27,67	24,57	29,23	F dx	30	ano	ano	ano
293	M		1	32,23	epi	100	32,71	58,73	64,53	F sin	nd	ano	ano	ne
342	M		0	60,02	cefalea	80	60,11	29,27	30,43	T sin	nd	ano	ne	ano

Tab. 31.

Pohlaví: M - muž, F - žena; žije: 0 - pacient zemřel, 1 - pacient žije (k 31.3.2012); věk při dg.: v letech; KPS - Karnofsky skóre, resekce: B - biopsie, PR - parciální resekce, RR - radikální resekce; věk při OP: v letech; OS od OP: přežití od operace (v měsících), lok: lokalizace nádoru (F - frontálně, P - parietálně, T - temporálně, O - okcipitálně, CC - corpus callosum); Ki-67: profil; index; nd - neprovedeno; Mikrovask. profil: mikrovaskulární proliferace

Anaplastický oligoastrocytom								
zdrojová data								
polyploidie	delece 1p	delece 19q	monosomie 10	amplifikace EGFR	delece(p16)	delece(RB1)	trisomie 7	
ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne
ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ano	ne	ne	ano	ne	ne	ne	ano	ano
ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne
ano	ne	ne	ne	ano	ano	ano	ne	ne
ano	ne	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne

Cytogenetic analyses in 81 patients with brain gliomas: correlation with clinical outcome and morphological data

Filip Kramar · Zuzana Zemanova · Kyra Michalova ·
Libuse Babicka · Sarka Ransdorfova · Petr Hrabal ·
Petr Kozler

Received: 8 December 2006 / Accepted: 16 February 2007 / Published online: 14 June 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract Specific gene mutations, loss of heterozygosity, deletions and/or amplifications of entire chromosomal regions and gene silencing have been described in gliomas. 82 samples from 81 patients were investigated to detect the deletion of *TP53*, *RB1*, *CDKN2A* genes, deletion of 1p36 and 19q13.3 region, amplification of *EGFR* gene, trisomy of chromosome 7 and monosomy of chromosome 10 in glial cells. Dual-colour interphase fluorescence in situ hybridization (I-FISH) with locus-specific and/or chromosome enumeration DNA probes were used for cytogenetic analyses. In the study, molecular cytogenetic analyses were successfully performed in 74 patients (91.3%) and were uninformative in 7 only (8.7%). The cytogenetic analyses were correlated with morphological data and clinical outcome. I-FISH was the essential part of diagnostics. In comparison with the clinical data, the patients' age seems to be a factor more important for the overall survival, rather than cytogenetic findings in glial tumours. The combined

deletion of 1p36 and 19q13.3 chromosomal regions predicts longer overall survival for patients with oligodendroglial tumours.

Keywords Glioma · Astrocytoma · Glioblastoma · Oligodendroglioma · Fluorescence *in situ* hybridization

Introduction

Gliomas form a heterogenous group of primary neuroepithelial brain tumours, which represent approximately 25% of all brain tumours in adults [1, 2]. Cytogenetic and molecular studies of glial tumours performed during the last decade identified several recurrent, nonrandom genetic abnormalities associated with different subtypes of glial tumours [3–5]. Specific gene mutations, loss of heterozygosity, deletions and/or amplifications of entire chromosomal regions were described in specific tumours including gliomas. Gliomas are characterized particularly by chromosomal deletions, inappropriately activated intracellular signalling pathways, and/or loss of the activity of tumour suppressor proteins [6–11].

The aim of this prospective study was to perform a detailed molecular cytogenetic study in a group of patients with histologically proved brain astrocytic or oligodendroglial tumour; to concentrate particularly on the detection of the most frequent and prognostically most important chromosomal aberrations described in those tumours so far, i.e. deletion of genes *TP53*, *RB1*, *CDKN2A*, *PTEN*, amplification of *EGFR* gene, loss of chromosome 10, deletion of chromosomal regions 1p36 and 19q13.3 in oligodendroglial tumours, and to compare the results of the molecular cytogenetic analysis in all patients with morphological and clinical findings.

F. Kramar (✉) · P. Kozler
Department of Neurosurgery, 1st Faculty of Medicine, Charles University and Central Military Hospital, Prague 16902, Czech Republic
e-mail: filip.kramar@uvn.cz

Z. Zemanova · K. Michalova · L. Babicka
Center of Oncocytogenetics, Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General Faculty Hospital and 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague 12808, Czech Republic

K. Michalova
Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague 12820, Czech Republic

P. Hrabal
Department of Pathology, Central Military Hospital, Prague 16902, Czech Republic

Materials and methods

Patients

The study comprises 81 patients with histologically confirmed glial tumours (WHO grade I–IV) admitted to the Department of Neurosurgery of the 1st Medical Faculty and Central Military Hospital in Prague between March 2004 and December 2005. All studies were carried out on cells acquired from tumour tissue taken during routinely performed neurosurgical procedures (82 tumour samples). Histological analysis was made by two fully trained pathologists of Department of Pathology in our hospital. All patients gave written informed consent to the provision of samples for cytogenetic research purposes in accordance with the ethical standards of the local ethics committee. Cytogenetic analysis was performed by Center of Oncocytogenetics, General Faculty Hospital in Prague. Every sample was analysed and confirmed by two cytogeneticists. In each group the clinical and morphological data were correlated with cytogenetic analyses. Dual-colour interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH) with locus-specific (LSI) and/or chromosome enumeration (CEP) DNA probes were used for cytogenetic analyses. At first, fresh non-fixed tumour tissue samples were resuspended in media (PBS, heparine) and further processed using a standard cytogenetic procedure (hypotonia, fixation). Standard microscopic preparations for I-FISH were made from fixed cell suspensions.

Fluorescence *in situ* hybridization

Dual-colour interphase FISH with LSI and/or CEP DNA probes (Abbott VysisTM) was carried out according to the producers' recommendations to detect the most frequent chromosomal changes in glial cells. Samples were analysed by the LSI dual-colour probe sets for the detection of deletion of *TP53*, *RB1* and *CDKN2A*, amplification of *EGFR* gene, trisomy of chromosome 7 and monosomy of

chromosome 10. Oligodendroglial tumour samples were also analysed for detection of the 1p36 and the 19q13 deletion (used probes are listed in Table 1). Cells were counterstained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole). Slides were viewed using the fluorescent motorized Axio-plan II microscope (Zeiss) with appropriate optical filters by two independent observers. In each case, hybridization signals of at least 200 tumour cell interphase nuclei were assessed. The ratio between the numbers of fluorescence signals of tested and control regions on chromosomes was calculated. The image was captured by a sensitive CCD camera and the result was processed by *ISIS* software (MetaSystemsTM) for further documentation.

The cut-off value (i.e. the breakpoint for classification of the findings as positive or negative) was determined using control group samples obtained by brain tissue resection in patients who underwent lesionectomy for epilepsy. In these samples, I-FISH analyses were performed using the same procedure and appropriate DNA probes. The average value and the standard deviation for the whole control group were determined. The breakpoint was defined as the average value +2 SD, which ensured the level of the diagnostic test specificity of 97.5% for amplifications and/or 95.0% for deletions, assuming normal error distribution.

Results

Clinical and morphological data

We examined 82 tissue samples in 81 patients with histologically proven glial tumours (Table 2). There were 48 men and 33 women with overall mean age 48.4 years (ranging from 15 to 79 years). The patient series was divided into three groups: Group 1—low-grade tumours; Group 2—high-grade astrocytic tumours; Group 3—oligodendroglial tumours. Group 1 consisted of 20 patients (21 samples—2 × pilocytic astrocytoma, 1 × ganglioglioma, 16 × fibrillary astrocytoma, 2 × gemistocytic astro-

Table 1 Type of chromosomal aberration and adequate DNA probe

Chromosomal aberration	DNA probe	Label	Manufacturer
<i>TP53</i> deletion	LSI® p53 (17p13.1)/CEP® 17	SO/SG	Abbott - Vysis TM
<i>CDKN2A</i> deletion	LSI® p16 (9p21)/CEP® 9		
<i>RB1</i> deletion	LSI <i>RB1</i> (13q14)/LSI® 13qter		
1p36 deletion	LSI® 1p36/LSI® 1q25		
19q13.3 deletion	LSI® 19q13/LSI® 19p13		
<i>EGFR</i> amplification	LSI® <i>EGFR</i> (7p12)/CEP® 7		
monosomy 10	CEP® 10/control CEP® probe		

SO – orange signal

SG – green signal

Table 2 Histological characteristics, WHO grade and number of analyzed samples of each glial subtype, mean age of each group of patients

Group	Tumour	No. of samples	Mean age	WHO grade
1	Pilocytic astrocytoma	2	35.2	I
	Ganglioglioma	1		II
	Fibrillary astrocytoma	16		II
	Gemistocytic astrocytoma	2		II
2	Anaplastic astrocytoma	11	41.7	III
	Glioblastoma multiforme	34	60.7	IV
3	Oligodendroglioma	4	44.6	II
	Anaplastic oligodendroglioma	10		III
	Anaplastic oligoastrocytoma	2		III

cytoma). The mean age of Group 1 was 35.2 years, there were 12 men and 8 women. Six patients from this group died during the follow-up (pt. 5, 12, 15, 17, 18, 19) of tumour progression, the mean overall survival (OS) in these six patients was 30 months. All other patients' condition remained stable and no tumour upgrading was found by routine MRI examinations. The mean follow-up was 39.6 months (ranging from 2 to 156 months); the mean progression-free survival (PFS) was 15.5 months. Group 2 included patients with anaplastic astrocytoma (AA) and glioblastoma (GBM) (11 anaplastic astrocytomas, 34 glioblastomas), whose mean age was 41.7 years for AAs, 60.7 years for GBMs, with 30 men and 15 women altogether. The mean follow-up of AA patients was 35.8 months (within the range of 3–77 months), six AA patients died during the follow-up, one of them (pt. 27) died within a month after the surgery (due to the occurrence of a haematoma in post-resection cavity and the development of severe hemiparesis, second intervention was performed but the patient's clinical status remained unchanged), the mean OS in these six patients was 32.2 months. The mean PFS in the group of AA patients was 8.3 months. The mean follow-up of GBM patients (Fig. 1) was 9.8 months, ranging from 1 to 27 months, the mean PFS was 6.4 months, and the mean OS was 8.7 months (28 patients died). All surviving GBM patients were younger than 60 years (pt. 36, 46, 52, 55, 57) except

one (pt. 60). Near total or gross total resection was achieved in all of them. In one secondary GBM patient (pt. 65), severe postoperative oedema developed after the surgery resulting in serious right hemiparesis and dysphasia, therefore no oncological treatment was recommended. Group 3 covered 16 patients (4 × oligodendroglioma, 10 × anaplastic oligodendroglioma, 2 × anaplastic oligoastrocytoma) with the mean age 44.6 years (6 men and 10 women). Around 14 patients are alive, two women died—one of tumour progression and the other of non-oncological disease (16 and 20 months respectively after the first symptom onset). The mean follow-up was 37.9 months (ranging from 4 to 135 months). Recurrence or tumour progression occurred in 6 cases (Fig. 2) (pt. 66, 67, 68, 71, 72, 79). The mean time of progression-free survival in Group 3 was 9.6 months (following the last surgery). Ten patients live at present without any symptoms of progression and/or recurrence of the disease. Clinical data of the patients are given in Tables 3–6.

Data of I-FISH analysis

Molecular cytogenetic findings are given in Tables 3–6. I-FISH results in most cases corresponded well with histological and clinical findings and confirmed the original diagnosis. Molecular cytogenetic analyses were successful in 75 samples (91%) and were uninformative in 7 samples.

Fig. 1 Glioblastoma multiforme, WHO Gr. IV.: (a) hematoxylin-eosin stain, high cellularity, necrosis, microvascular proliferation; (b) Ki-67 index, increased mitotic activity

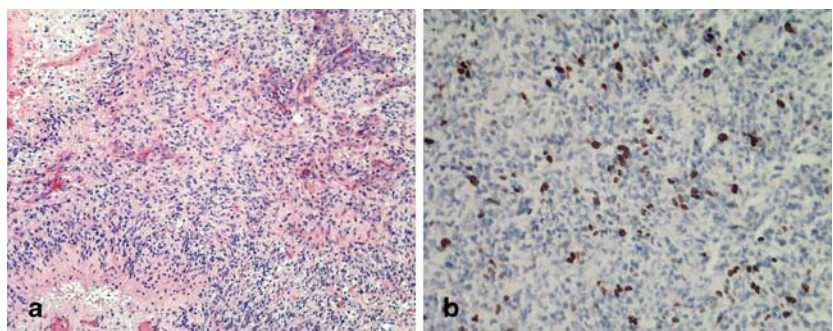


Fig. 2 Anaplastic oligodendroglioma, WHO Gr. III.: (a) hematoxylin-eosin stain, high cellularity, microvascular proliferation, perinuclear halo; (b) Ki-67 index, increased mitotic activity

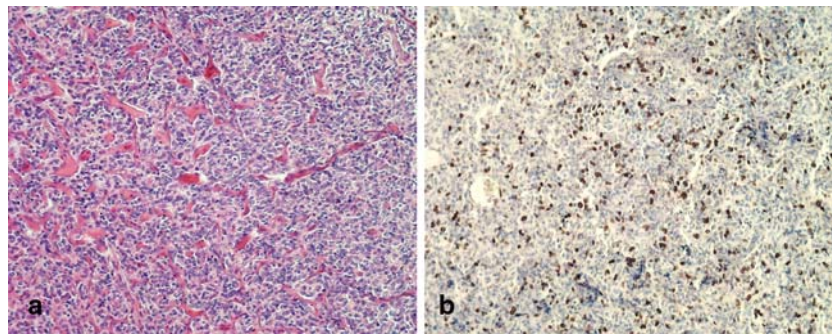


Table 3 Clinical data and molecular cytogenetic findings in group of low-grade gliomas

No of pt.	Age at dg.	Sex	Dg.	WHO Gr.	Loc.	KFS	Resection	E	Therapy	Recurrence or progression	PFS	OS	I-FISH results
1	15	M	PA	I	optic nerve	100	subtotal	no	WS	no	25+	35+	polyploidy
2	35	M	PA	I	C	100	total	no	WS	no	21+	21+	normal
3	31	F	GG	I	C	100	total	no	WS	no	12+	12+	normal
4	26	F	FA	II	F	100	parcial	yes	WS	no	26+	26+	–10, polyploidy
5	31	M	FA	II	TO	0	parcial	yes	RT+CHT	yes	19	21	del(17)(p13.1), polyploidy
6	27	M	FA	II	TPO	90	parcial	no	WS	yes	4		del(9)(p21), del(13)(q14), polyploidy
	28	M	FA	II	T	100	parcial			no	17+	21+	del(9)(p21), del(13)(q14), polyploidy
7	21	F	FA	II	F	100	subtotal	yes	WS	no	17+	17+	polyploidy
8	29	M	FA	II	F	100	parcial	yes	WS	no	16+	16+	normal
9	57	M	FA	II	TP	100	parcial	yes	WS	no	13+	18+	polyploidy
10	33	M	FA	II	F, CC	90	parcial	yes	WS	no	12+	35+	normal
11	37	M	FA	II	FP	90	parcial	yes	RT	no	23+	58+	polyploidy
12	38	M	GA	II	F	0	parcial	yes	CHT	yes	20	38	del(9)(p21), polyploidy
13	50	F	FA	II	FT	100	parcial	yes	WS	no	24+	156+	polyploidy
14	39	M	FA	II	F	100	parcial	yes	WS	no	23+	58+	polyploidy
15	61	F	FA	II	F, CC	0	biopsy	no	RT	yes	0	2	del(13)(q14), polyploidy
16	33	M	FA	II	T	100	parcial	yes	WS	no	21+	56+	del(13)(q14)
17	34	F	FA	II	T	0	parcial	yes	CHT	yes	4	55	polyploidy
18	27	F	FA	II	BG	0	biopsy	no	RT	yes	0	9	polyploidy
19	29	M	FA	II	T	0	parcial	yes	RT	yes	5	55	normal
20	59	F	GA	II	T	80	parcial	yes	RT	no	11+	83+	normal

Histological diagnosis: PA—pilocytic astrocytoma, GG—ganglioglioma, FA – fibrillary astrocytoma, GA—gemistocytic astrocytoma

Localization: F—frontal lobe, T—temporal lobe, P—parietal lobe, O—occipital lobe, CC—corpus callosum, BG—basal ganglia, C—cerebellum

KFS—Karnofsky score at last follow-up (6/06), E—epilepsy

Therapy: CHT—chemotherapy (temozolomide), RT—radiotherapy, WS— watch and scan

PFS—progression-free survival in months, OS—overall survival in months

Our series included 20 patients with low-grade glioma (Table 3). No significant chromosomal changes in pilocytic astrocytoma or ganglioglioma samples were found, only polyploidy was detected in one pilocytic astrocytoma sample (in our study, the polyploidy is defined as three and more signals of each used probe). We examined 18 astrocytoma tissue specimens (16 fibrillary astrocytomas, 2

gemistocytic astrocytomas) with polyploidy being the most frequent finding, but in six cases other chromosomal changes were detected. We proved *TP53* deletion only in one case (this patient died of tumour progression 21 months after the surgery—pt. 5), in other cases the analyses of *TP53* were normal. In one patient a combined deletion of *RB1* and *CDKN2A* gene was found (pt. 6). This

Table 4 Clinical data and molecular cytogenetic findings in anaplastic astrocytomas

No of pt.	Age at dg.	Sex	Dg.	WHO Gr.	Loc.	KFS	Resection	E	Therapy	Recurrence or progression	PFS	OS	I-FISH results
21	54	F	AA	III	F	0	biopsy	yes	none	yes	0	4	del(9)(p21), del(13)(q14)
22	31	M	AA	III	TP	0	parcial	no	RT+CHT	yes	1	76	polyploidy
23	29	M	AA	III	F	0	parcial	yes	RT	yes	10	52	del(9)(p21), del(13)(q14), polyploidy
24	31	M	AA	III	BG	0	subtotal	no	RT+CHT	yes	1	45	polyploidy
25	29	F	AA	III	C	80	subtotal	no	RT+CHT	no	21+	77+	del(9)(p21) biallelic, polyploidy
26	43	F	AA	III	FT	90	parcial	no	RT+CHT	no	20+	77+	del(9)(p21) biallelic
27	68	M	AA	III	TP	0	subtotal	no	RT	yes	0	13	del(9)(p21) biallelic, polyploidy
28	34	F	AA	III	P	60	parcial	yes	RT+CHT	yes	13	20+	normal
29	66	F	AA	III	T	0	parcial	no	none	yes	0	3	del <i>RBI</i>
30	27	M	AA	III	T	100	parcial	yes	RT+CHT	no	15+	15+	del(9)(p21) biallelic, polyploidy
31	58	F	AA	III	F	90	parcial	no	RT+CHT	yes	10	12+	polyploidy

Histological diagnosis: AA—anaplastic astrocytoma

Localization: F—frontal lobe, T—temporal lobe, P—parietal lobe, O—occipital lobe, CC—corpus callosum, BG—basal ganglia, C—cerebellum

KFS—Karnofsky score at last follow-up (6/06), E—epilepsy

Therapy: CHT—chemotherapy (temozolomide), RT—radiotherapy

PFS—progression-free survival in months, OS—overall survival in months

patient underwent second procedure for early tumour progression, but the histological and also cytogenetic analysis remained the same. In other two patients (pt. 15, 16) only *RBI* deletion was detected. In one sample of gemistocytic astrocytoma, deletion of *CDKN2A* was found in more than 50% of tumour cell nuclei. No significant chromosomal aberration was detected in four cases (pt. 8, 10, 19, 20).

The subgroup of anaplastic astrocytomas contained 11 patients (Table 4). In one patient, the cytogenetic analysis did not show any significant change (pt. 28). The most frequent chromosomal aberration was the deletion of *CDKN2A*, biallelic (pt. 25, 26, 27, 30) in four of six samples proving *CDKN2A* deletion (Fig. 3a) and combined with polyploidy in four cases. In three cases, the deletion of *RBI* was found, twice as a combined *RBI* and *CDKN2A* deletion (pt. 21, 23). In 3 cases, however, only polyploidy was found (pt. 22, 24, 31).

Around 34 patients were included in the group of glioblastomas (mostly primary glioblastomas) (Table 5). The most frequent aberration was the monosomy of chromosome 10 (found in 30 of 34 examined GBM specimen). One specimen showed no abnormality (pt. 34). In other 33 histologically defined GBM samples, the monosomy of chromosome 10 was not detected in only three of them, in two of these 3 samples another typical GBM abnormality was ascertained (*EGFR* amplification) (pt. 32, 35). In the last one, only polyploidy was present (pt. 54). In 14 tissue samples, the amplification of *EGFR* gene was found, in 14 patients the trisomy of chromosome 7. However, a combined trisomy of chromosome 7 and *EGFR* amplification

(Fig. 3b) was present only in two patients (pt. 33, 41). In 8 patients, the monosomy of chromosome 10 combined with polyploidy was found.

In Group 3, a combined deletion of 1p36 and 19q13.3 regions (Fig. 4a and b) was proved in 13 patients (Table 6). Besides 1p36/19q13 deletions, additional genetic alterations typical for high-grade gliomas were detected in six of the patients, the *EGFR* amplification or the polysomy of chromosome 7 in four cases (pt. 68, 72, 74, 78), the monosomy 10 in two cases (pt. 67, 72), the monosomy 9 or deletion of *CDKN2A* in four samples (66, 67, 68, 72), and the deletion of *RBI* gene in one case (pt. 72). Recurrence or tumour progression appeared in six of all cases in Group 3. In one patient (pt. 76), isolated deletion of 1p36 was detected. One tumour sample (pt. 70) was classified as normal without any chromosomal alterations.

Discussion

Astrocytomas are the most common primary brain tumours. Diffuse astrocytomas are slowly growing astrocytic tumours. In patients who present no or slight neurological deficit they are generally manifested by seizures. The deletion or mutation of both copies of *TP53* gene is the basic genetic aberration in diffuse astrocytomas [12]. Besides the change of *TP53* status, the loss of *RBI* gene is often found [8]. The disease can remain stable for a long period (years) and only repeated MRI examinations detect slow tumour growth. After a few years (usually 3–5 years)

Table 5 Clinical data and molecular cytogenetic findings in glioblastomas

No of pt.	Age at dg.	Sex	Dg.	WHO Gr.	Loc.	KFS	Resection	E	Therapy	Recurrence or progression	PFS	OS	I-FISH results
32	59	F	GBM	IV	BG	0	biopsy	no	none	yes	0	3	amp(7)(p12), del(9)(p21), del(13)(q14)
33	51	M	GBM	IV	F	0	parcial	yes	RT + CHT	yes	11	17	amp(7)(p12), del(9)(p21), +7, -10
34	79	M	GBM	IV	T	0	parcial	no	RT	yes	3	5	normal
35	55	M	GBM	IV	F	0	subtotal	yes	RT + CHT	yes	8	16	amp(7)(p12), polyploidy
36	45	M	GBM	IV	FT	40	subtotal	yes	RT + CHT	no	24+	27+	del(9)(p21) biallelic, del(13)(q14), +7, -10
37	75	F	GBM	IV	F	0	parcial	no	none	yes	0	1	+7, -10, polyploidy
38	59	M	GBM	IV	O	0	parcial	yes	RT + CHT	yes	10	12	-10, polyploidy
39	46	M	GBM	IV	T	0	total	yes	RT + CHT	yes	13	23	+7, -10
40	73	F	GBM	IV	FT	0	parcial	no	RT	yes	2	4	amp(7)(p12), +7, -10, polyploidy
41	63	M	GBM	IV	T	0	parcial	no	RT	yes	12	15	+7, -10, polyploidy
42	74	M	GBM	IV	O	0	subtotal	no	RT	yes	2	4	-10, polyploidy
43	65	F	GBM	IV	F	0	parcial	no	RT + CHT	yes	8	19	amp(7)(p12), del(17)(p13.1), -10
44	61	M	GBM	IV	F	0	subtotal	no	RT	yes	4	7	+7, -10
45	58	F	GBM	IV	F, CC	0	subtotal	no	RT	yes	4	6	+7, -10, polyploidy
46	55	M	GBM	IV	T	100	total	no	RT + CHT	yes	8	11+	-10, polyploidy
47	68	F	GBM	IV	P	0	biopsy	no	RT	yes	0	4	+7, -10, polyploidy
48	40	F	GBM	IV	P	0	subtotal	no	RT + CHT	yes	11	17	amp(7)(p12), -10
49	65	F	GBM	IV	PO	0	parcial	no	RT	yes	0	2	+7, -10, polyploidy
50	65	M	GBM	IV	T	0	parcial	no	RT + CHT	yes	5	7	amp(7)(p12), -10
51	63	M	GBM	IV	BG	0	parcial	no	none	yes	0	1	amp(7)(p12), -10, polyploidy
52	59	M	GBM	IV	P	70	parcial	no	RT + CHT	no	15+	16+	+7, -10
53	65	M	GBM	IV	P	0	biopsy	no	RT	yes	6	10	-10, polyploidy
54	71	M	GBM	IV	F	0	parcial	no	RT + CHT	yes	14	16	polyploidy
55	51	M	GBM	IV	T	100	total	yes	RT + CHT	no	15+	16+	amp(7)(p12), -10, polyploidy
56	48	M	GBM	IV	F, CC	0	biopsy	no	RT + CHT	yes	2	5	amp(7)(p12), -10
57	48	F	GBM	IV	T	100	total	yes	RT + CHT	no	14+	14+	+7, -10
58	52	M	GBM	IV	F	0	parcial	no	RT + CHT	yes	9	14	amp(7)(p12), -10
59	58	M	GBM	IV	P	0	total	yes	RT + CHT	yes	3	6	amp(7)(p12), -10
60	67	M	GBM	IV	F	90	subtotal	no	RT + CHT	yes	10	13+	+7, -10
61	55	M	GBM	IV	T	0	parcial	yes	RT	yes	0	2	-10, polyploidy
62	73	M	GBM	IV	T	0	parcial	yes	RT + CHT	yes	3	7	-10, polyploidy
63	72	M	GBM	IV	TP	0	parcial	yes	RT	yes	0	4	+7, -10
64	67	M	GBM	IV	F, CC	0	biopsy	no	none	yes	0	1	+7, -10
65	51	M	GBM	IV	T	0	parcial	yes	none	yes	0	7	amp(7)(p12), -10, polyploidy

Histological diagnosis: AA—anaplastic astrocytoma

Localization: F—frontal lobe, T—temporal lobe, P—parietal lobe, O—occipital lobe, CC—corpus callosum, BG—basal ganglia

KFS—Karnofsky score at last follow-up (6/06), E – epilepsy

Therapy: CHT - chemotherapy (temozolomide, lomustin), RT – radiotherapy

PFS—progression-free survival in months, OS—overall survival in months

the growth of astrocytoma accelerates and MRI examination detects regions of gadolinium enhancement within the original tumour. This sign usually indicates malignant upgrading into malignant anaplastic astrocytoma (AA) or GBM. The mechanism of tumour development remains

unclear in patients with pilocytic astrocytoma and ganglioglioma. Corresponding to this fact we did not find any significant chromosomal changes in these patients, except for polyploidy in one of them. The prognosis in these tumours is excellent in comparison with other tumour types

Table 6 Clinical data and molecular cytogenetic findings in oligodendroglial tumours

No of pt.	Age at dg.	Sex	Dg.	WHO Gr.	Loc.	KFS	Resection	E	Therapy	Recurrence or progression	PFS	OS	I-FISH results
66	36	M	AO	III	F	100	total	yes	CHT	yes	25	78+	del(1)(p36), del(19)(q13.3), del(9)(p21)
67	54	F	AO	III	F	0	parcial	no	CHT	yes	12	16	del(1)(p36), del(19)(q13.3), del(9)(p21), -10
68	38	M	AO	III	F	100	total	yes	RT+CHT	yes	6	25+	del(1)(p36), del(19)(q13.3), del(9)(p21), +7, -10
69	38	F	AO	III	CC	100	biopsy	no	CHT	no	18+	18+	normal
70	59	M	AO	III	PT	100	parcial	no	CHT	no	13+	13+	normal
71	52	F	AO	III	PT	100	parcial	yes	CHT	yes	10	21+	del(1)(p36), del(19)(q13.3)
72	24	M	AO	III	F	100	total	no	RT+CHT	yes	7	58+	del(1)(p36), del(19)(q13.3), del(9)(p21), del(13)(q14), +7, -10
73	69	F	AO	III	F	90	total	no	CHT	no	5+	5+	del(1)(p36), del(19)(q13.3)
74	62	F	AO	III	F	90	parcial	no	CHT	no	4+	4+	del(1)(p36), del(19)(q13.3), +7
75	30	M	AO	III	F	100	parcial	yes	RT+CHT	no	6+	135+	del(1)(p36), del(19)(q13.3)
76	24	F	AOA	III	F	100	total	yes	CHT	no	13+	68+	del(1)(p36), del(19)(q13.3)
77	39	F	AOA	III	F	100	parcial	no	RT+CHT	no	9+	9+	del(1)(p36)
78	56	F	0	II	F	0	parcial	yes	WS	no	11+	20	del(1)(p36), del(19)(q13.3), +7
79	31	F	0	II	F	100	total	yes	WS	yes	3	79+	del(1)(p36), del(19)(q13.3)
80	54	F	0	II	F	100	biopsy	yes	WS	no	7+	53+	del(1)(p36), del(19)(q13.3)
81	30	M	0	II	F	100	total	yes	WS	no	4+	4+	del(1)(p36), del(19)(q13.3)

Histological diagnosis: AA—anaplastic astrocytoma

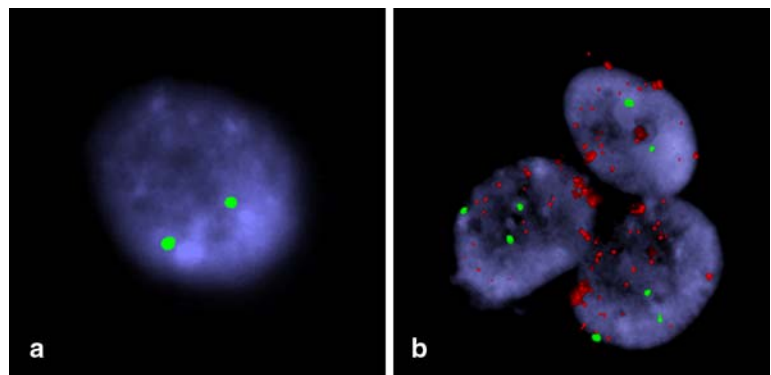
Localization: F—frontal lobe, T—temporal lobe, P—parietal lobe, O—occipital lobe, CC—corpus callosum, BG—basal ganglia

KFS—Karnofsky score at last follow-up (6/06), E—epilepsy

Therapy: CHT—chemotherapy (temozolomide, PCV), RT—radiotherapy, WS—watch and scan

PFS – progression-free survival in months, OS – overall survival in months

Fig. 3 Cytogenetic analysis; (a) biallelic deletion of 9p21 (*CDKN2A*), missing orange signal, green signal—centromere of chromosome 9, LSI® *p16* (9p21)/CEP® 9, anaplastic astrocytoma; (b) amplification of 7p12 region (*EGFR*), orange signal, trisomy of chromosome 7, green signal—centromere of chromosome 7, LSI® *EGFR*/CEP® 7, glioblastoma multiforme

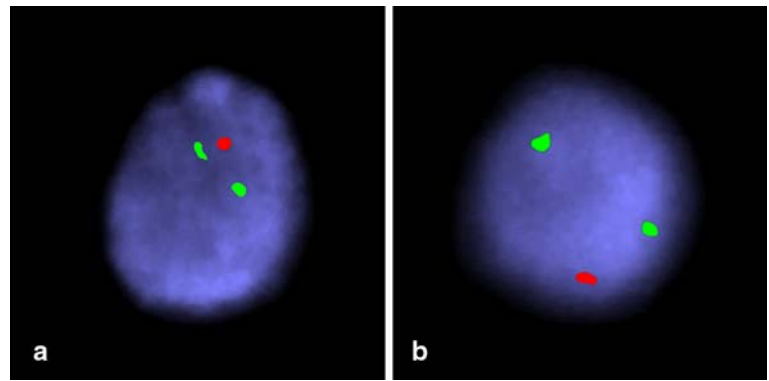


[13]. Median overall survival in grade II astrocytomas is about 7.5 years [14]. The supposed primary change is *TP53* gene aberration by deletion or point mutation. In six cases of diffuse astrocytomas, a significant chromosomal abnormality was found but *TP53* deletion was observed in only one case. This finding corresponds to the fact that point mutation is the main cause of *TP53* aberration, rather than gene deletion [15]. Only *RB1* deletion was detected in two cases and a combined *RB1* and *CDKN2A* deletion in another one. Although there is no significant mark of tumour

upgrading during the routine follow-up in the surviving patients, we suppose that earlier tumour progression can occur in these patients [16, 17]. On the other hand, there were three patients who died of tumour progression and no significant chromosomal change was discovered in their tumour samples. Based on this fact, other markers may exist and should be identified which can influence the prognosis and survival of patients with diffuse astrocytomas.

Anaplastic astrocytomas show increased anaplasia, demonstrated by the presence of mitoses, increased

Fig. 4 Cytogenetic analysis; (a) deletion of 1p36 region, missing one orange signal, green signal—1q25 region, LSI® 1p36/LSI® 1q25; (b) deletion of 19q13.3, missing one orange signal, green signal—19p13 region, LSI® 19q13/LSI® 19p13, anaplastic oligodendroglioma



cytoplasmic variability, and increased endothelial cell proliferation. Necrotic tissue is not present. Genetic abnormalities found in diffuse astrocytomas are also detected in AAs. In addition, the deletion (often biallelic) of *CDKN2A* gene (9p21) and/or the monosomy of chromosome 10 are found more frequently [18]. Our subgroup of anaplastic astrocytomas included 11 patients. In AA, *CDKN2A* deletion, especially biallelic deletion of this gene, should be linked with bad prognosis because of the important and very specific role of this gene in the regulation of cell cycle [19, 20]. The clinical data of three of these patients (pt. 21, 23, 27) identified faster tumour progression and death within 2 years after the surgery. In contrast, the remaining three patients with proven *CDKN2A* deletion are still alive (all of them have biallelic deletion and all of them are younger than 45 years—pt. 25, 26, 30). In comparison with the clinical data, the patients' age seems to be a factor more important for overall survival, rather than cytogenetic findings. On the other hand, biallelic *CDKN2A* deletion is a known marker of bad prognosis in many non-gliar tumours [21–23].

Unfortunately, the most frequent type of astrocytic tumours is glioblastoma multiforme (GBM). The prognosis of patients with GBM is very grim, most patients die within 12 months. From the genetic point of view, at least two subgroups of GBM were identified, of which primary GBM is more frequent (approx. 80% of all GBMs). Tumour affects predominantly older people. The most frequent genetic abnormality in primary GBMs is the monosomy of chromosome 10 [24, 25]. In our series, the monosomy of 10 was not present in only 4 of 34 histologically defined GBM samples. In two of these 4 samples (without the monosomy of 10), another abnormality typical for GBM was detected (*EGFR* amplification). Only polyploidy was present in another GBM tissue sample, however, the sample may have been acquired from a non-upgraded part of tumour (secondary GBM). It is rarely found in other glioma subtypes [26]. In one case, cytogenetic analysis did not prove any chromosomal changes, the tissue sample was probably taken from normal brain tissue surrounding the tumour. *MGMT* gene is located on the chromosome 10.

Hypermethylation of its promoter can lead to *MGMT* gene silencing and plays an important role in GBM chemosensitivity to temozolomide [27–29]. There remains the question whether the monosomy 10 influences this chemosensitivity or not.

Amplification of *EGFR* gene (7p12) is detected in 40% of primary GBMs [30–33]. The *EGFR* amplification, in contrast, is very rare in secondary GBMs [34]. In our series *EGFR* amplification was found in 14 tissue samples. In 14 patients, the trisomy of chromosome 7 was found but *EGFR* amplification was not present. Only in one patient a combined trisomy of chromosome 7 and *EGFR* amplification was proved. There exists a probability that the trisomy 7 leads to overexpression of EGF receptor, which could have a very similar effect to *EGFR* amplification. Epidermal growth factor (EGF) belongs to the most prominent growth stimulating factors for glial cells and is involved in autocrine growth factor loops in these cells. Given the importance of the EGF receptor in GBMs, disruption of activation of this receptor appears to be an excellent target for future therapy. The monosomy of chromosome 10, *EGFR* amplification and the trisomy of chromosome 7 are the most frequent chromosomal anomalies in GBMs and they are very often found together, which could point to their coactive effect in GBMs tumorigenesis. In approximately 10% of primary GBMs amplification of *MDM2* and *CDK4* gene is found [35]. Contrary to primary GBM, secondary glioblastoma develops from semimalignant gliomas like diffuse astrocytoma and anaplastic astrocytoma over longer period of time. Unfortunately, statistically significant difference in PFS and OS in GBM patients has not been observed when comparing the chromosomal aberrations with one another.

Tumours with oligodendroglial component, pure oligodendrogliomas or oligoastrocytomas compose a different group of gliomas. Oligodendroglial tumours are primary glial brain tumours that are divided into oligodendroglioma (O) and anaplastic oligodendroglioma (AO). Besides the “pure” oligodendrogliomas and astrocytomas, there is also a mixed form—oligoastrocytomas (OA). Oligoastrocytomas

are also divided into two subgroups—oligoastrocytoma and anaplastic oligoastrocytoma. The tumorigenesis of oligodendroglial tumours remains unclear [36–40]. There has not been detected any candidate tumour-suppressor gene in 1p or 19q chromosomal region which could explain the tumour development. Typically, oligodendroglial tumours have an indolent course and patients may survive for many years after symptom onset. Their good prognosis relative to other parenchymal tumours probably stems from the inherently less aggressive biological behaviour. The most frequent chromosomal change is a combined deletion of 1p36 and 19q13.3 [41–43], found in more than 70% of oligodendrogliomas.

Os or OAs with del(1)(p36)/del(19)(q13.3) have better prognosis and longer overall survival than those which are tested negative for this combined deletion. In our patient series, neither del(1)(p36) nor del(19)(q13.3) deletion was found in only 2 from 16 samples in total, in one of these 2 samples non-adequate biopsy was taken (normal brain tissue) and repeated biopsy confirmed histological diagnosis of anaplastic oligodendroglioma. In one specimen only del(1)(p36) deletion was detected. We confirmed a high incidence of del(1)(p36)/del(19)(q13.3) in oligodendroglial tumours. The clinical data of our series suggest more favourable outcome of oligodendrogliomas compared to astrocytic tumours [44–47]. According to Cairncross study we suppose the patients with additional *CDKN2A* deletion (4 patients out of 14) have worse prognosis with higher incidence of early progression and recurrence of the disease. Only one patient with AO died in our series, but similarly to AA and GBM patients, the patients' age seems to be the most important factor for the patient prognosis. The clinical implications of the combined deletion of 1p36 and 19q13.3 were further elucidated by the inclusion of OAs. Similar to Os, del(1)(p36)/del(19)(q13.3) can predict longer survival also for patients with OAs.

Conclusion

Genetic studies may notably increase our understanding of gliomas. Although the treatment strategy of patients with primary brain tumours has been significantly improved, together with these improvements there rises the importance of detecting of chromosomal changes in tumour cells. Systematic molecular cytogenetic analyses may advance diagnosis, grading and classification of these tumours and I-FISH is a powerful tool for surveying chromosomal aberrations in brain tumour cells. I-FISH plays the essential part in the diagnostics. It is very likely that, in the future, such comprehensive molecular cytogenetic analysis will bring advanced prognosis and treatment in patients with

brain gliomas. Ideally, we should be able to individualize the tumours and thus individually tailor the treatment.

Acknowledgements Supported by grant IGA MZ CR 1A/8237-3.

References

1. Fleury A, Menegoz F, Grosclaude P, Daures JP, Henry-Amar M, Raverdy N, Schaffer P, Poisson M, Delattre JY (1997) Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in France. *Cancer* 79:1195–1202
2. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS (2002) Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-oncol* 4:278–299
3. Kleihues P, Cavenee WK (2000) Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. IARC Press, Lyon
4. Giese A, Westphal M (1996) Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* 39:235–250
5. Noble M, Mayer-Proschel M (1997) Growth factors, glia and gliomas. *J Neuro-Oncol* 35:193–209
6. Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH (1998) p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395:124–125
7. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG (1998) ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92:725–734
8. Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP (2000) Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res* 60:417–424
9. Bigner SH, Wong AJ, Mark J, Muhlbaier LH, Kinzler KW, Vogelstein B, Bigner DD (1987) Relationship between gene amplification and chromosomal deviations in malignant human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 29:165–170
10. Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2001) p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* 11:159–168
11. Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1997) Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 94:303–309
12. Rasheed BK, McLendon RE, Herndon JE, Friedman HS, Friedman AH, Bigner DD, Bigner SH (1994) Alterations of the TP53 gene in human gliomas. *Cancer Res* 54(5):1324–1330
13. Kluwe L, Hagel C, Tatagiba M, Thomas S, Stavrou D, Ostertag H, von Deimling A, Mautner VF (2001) Loss of NF1 alleles distinguish sporadic from NF1-associated pilocytic astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:917–920
14. van den Bent MJ, Afra D, de Witte O, Ben Hassel M, Schraub S, Hoang-Xuan K, Malmstrom PO, Collette L, Pierart M, Mirimanoff R, Karim AB (2005) EORTC Radiotherapy and Brain Tumor Groups and the UK Medical Research Council: long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. *Lancet* 366(9490):985–990
15. Patt S, Gries H, Giraldo M, Cervos-Navarro J, Martin H, Janisch W, Brockmoller J (1996) p53 gene mutations in human astrocytic brain tumors including pilocytic astrocytomas. *Hum Pathol* 27(6):586–589
16. Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers L, Oberstrass J, An HX, Niederacher D, Wechsler W, Reifenberger G (1996) Anal-

- ysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:822–831
17. Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1997) Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 3:523–530
 18. Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, Hirose T, Hirato J, Funada N, Fujimaki T, Hojo S, Kubo O, Ide T, Usui M, Ochiai C, Ito S, Takahashi H, Mukasa A, Asai A, Kirino T (2002) Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res* 8:196–201
 19. Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 54:6353–6358
 20. Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efrid JT, von Deimling A, Louis DN (1996) CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56:150–153
 21. Grafstrom E, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J, Platz A (2005) Biallelic deletions in INK4 in cutaneous melanoma are common and associated with decreased survival. *Clin Cancer Res* 11(8):2991–2997
 22. Hu N, Wang C, Su H, Li WJ, Emmert-Buck MR, Li G, Roth MJ, Tang ZZ, Lu N, Giffen C, Albert PS, Taylor PR, Goldstein AM (2004) High frequency of CDKN2A alterations in esophageal squamous cell carcinoma from a high-risk Chinese population. *Genes Chromosomes Cancer* 39(3):205–216
 23. Thompson PM, Maris JM, Hogarty MD, Seeger RC, Reynolds CP, Brodeur GM, White PS (2001) Homozygous deletion of CDKN2A (p16INK4a/p14ARF) but not within 1p36 or at other tumor suppressor loci in neuroblastoma. *Cancer Res* 61(2):679–686
 24. Maehama T, Dixon JE (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273(22):13375–13378
 25. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1998) PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(7):684–689
 26. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2000) Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 80(1):65–72
 27. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG (2001) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343:1350–1354. Erratum in: *N Engl J Med* 344:686–688
 28. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):997–1003
 29. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group: radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):987–996
 30. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J (1985) Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* 313(5998):144–147
 31. Chaffanet M, Chauvin C, Laine M, Berger F, Chedin M, Rost N, Nissou MF, Benabid AL (1992) EGF receptor amplification and expression in human brain tumours. *Eur J Cancer* 28:11–17
 32. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7727–7731
 33. Ekstrand AJ, Longo N, Hamid ML, Olson JJ, Liu L, Collins VP, James CD (1994) Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene* 9:2313–2320
 34. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6:217–223, discussion 23–24
 35. Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J, Elkahlon AG, Meltzer PS, Collins VP (1996) Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res* 56:5141–5145
 36. Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP (1994) Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 145:1175–1190
 37. Alonso ME, Bello MJ, Lomas J, Gonzalez-Gomez P, Arjona D, De Campos JM, Gutierrez M, Isla A, Vaquero J, Rey JA (2001) Absence of mutation of the p73 gene in astrocytic neoplasms. *Int J Oncol* 19:609–612
 38. Mai M, Huang H, Reed C, Qian C, Smith JS, Alderete B, Jenkins R, Smith DI, Liu W (1998) Genomic organization and mutation analysis of p73 in oligodendrogliomas with chromosome 1 p-arm deletions. *Genomics* 51:359–363
 39. Smith JS, Tachibana I, Lee HK, Qian J, Pohl U, Mohrenweiser HW, Borell TJ, Hosek SM, Soderberg CL, von Deimling A, Perry A, Scheithauer BW, Louis DN, Jenkins RB (2000) Mapping of the chromosome 19 q-arm glioma tumor suppressor gene using fluorescence in situ hybridization and novel microsatellite markers. *Genes Chromosomes Cancer* 29:16–25
 40. Smith JS, Tachibana I, Pohl U, Lee HK, Thanarajasingam U, Portier BP, Ueki K, Ramaswamy S, Billings SJ, Mohrenweiser HW, Louis DN, Jenkins RB (2000) A transcript map of the chromosome 19q-arm glioma tumor suppressor region. *Genomics* 64:44–50
 41. Mukasa A, Ueki K, Matsumoto S, Tsutsumi S, Nishikawa R, Fujimaki T, Asai A, Kirino T, Aburatani H (2002) Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p. *Oncogene* 21:3961–3968
 42. Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A (1995) Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:91–95
 43. Zemanova Z, Kramar F, Babicka L, Ransdorfova S, Melicherikova J, Hrabal P, Kozler P, Michalova K (2006) Molecular cytogenetic stratification of recurrent oligodendrogliomas: utility of interphase fluorescence in situ hybridization (I-FISH). *Folia Biol* 52(3):71–8
 44. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN (1998) Specific genetic predictors of

- chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90:1473–1479
45. Cairncross G, Berkey B, Shaw E, Jenkins R, Scheithauer B, Brachman D, Buckner J, Fink K, Souhami L, Laperriere N, Mehta M, Curran W (2006) Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: intergroup radiation therapy oncology group trial 9402. *J Clin Oncol* 24(18):2707–2714
46. van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, Sanson M, Taphoorn MJ, Bernsen HJ, Frenay M, Tijssen CC, Grisold W, Sipos L, Haaxma-Reiche H, Kros JM, van Kouwenhoven MC, Vecht CJ, Allgeier A, Lacombe D, Gorlia T (2006) Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: A randomized European organisation for research and treatment of cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 24(18):2715–2722
47. Gilbert MR, Lang FF (2006) Anaplastic oligodendroglial tumors: a tale of two trials. *J Clin Oncol* 24(18):2689–2690

Patogeneze mozkových gliomů, I. část. Úvod do problematiky, patogeneze astrocytárních nádorů

Kramář F.¹, Zemanová Z.², Michalová K.², Babická L.², Ransdorfová Š.², Kozler P.¹, Netuka D.¹

¹Neurochirurgická klinika 1. LF UK, IPVZ a ÚVN, Praha

²Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK, Praha

Souhrn

Primární mozkové nádory představují pouze malou část onkologických onemocnění, ale pro své nositele znamenají velký zásah do života. Pro ošetřující lékaře těchto nemocných pak velký terapeutický problém. Patogeneze mozkových nádorů je stále ve velké míře neznámá. Cílem sdělení je ukázat na současné poznatky o vzniku a vývoji gliálních tumorů z genetického hlediska. První část je zaměřena na obecné informace o buněčném cyklu, signálních buněčných cestách, invazivitě, angiogenezi, buněčné apoptóze a patogenezi astrocytárních nádorů.

Klíčová slova: gliom, signální cesta, difuzní gliom, anaplastický astrocytom, glioblastom

Summary

Kramář F., Zemanová Z., Michalová K., Babická L., Ransdorfová Š., Kozler P., Netuka D.: Pathogenesis of Cerebral Gliomas, Part I: Introduction, Pathogenesis of Astrocytic Tumors

Primary cerebral tumors represent only a small part of oncological diseases but a great intervention into a life of the subjects affected. They imply big therapeutical problems for physicians treating these patients. Pathogenesis of cerebral tumors has been still unknown to a large extent. The aim of the report is to show present knowledge about the rise and development of glial tumors from the view of genetics. The first part gives general information about a cellular cycle, signalling cellular pathways, invasivity, angiogenesis, cellular apoptosis and pathogenesis of astrocytic tumors.

Key words: glioma, signalling pathway, diffuse glioma, anaplastic astrocytoma, glioblastoma

Úvod

Mozkové nádory, ačkoli postihují pouze malou část nemocných, provázejí lidstvo od počátku. Nicméně o patogenezi víme stále velice málo. Virchow v roce 1867 byl první, kdo předpokládal, že gliomy vyrůstají z intersticiální mozkové tkáně. Golgi v roce 1875 rozdělil gliomy na „tvrdé“ a „měkké“ formy na základě výskytu odlišného hvězdicovitého tvaru neurogliálních buněk. První, kdo užil termín glioblastoma multiforme, byli Percival Bailey a Harvey Cushing, kteří v roce 1926 publikovali „A Classification of Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis“ (1). Navrhovali opustit dosavadní nejednotnou terminologii. Termín, který použili, lépe vystihoval podstatu tohoto typu gliomu: 1. vyrůstá z nejprimitivnějších prekurzorů podpůrné mozkové tkáně (glioblasty), 2. morfologie nádoru

✉ Korespondující autor:

MUDr. Filip Kramář

Neurochirurgická klinika

1. LF UK

Ústřední vojenská nemocnice,

U vojenské nemocnice 1200,

169 02 Praha 6

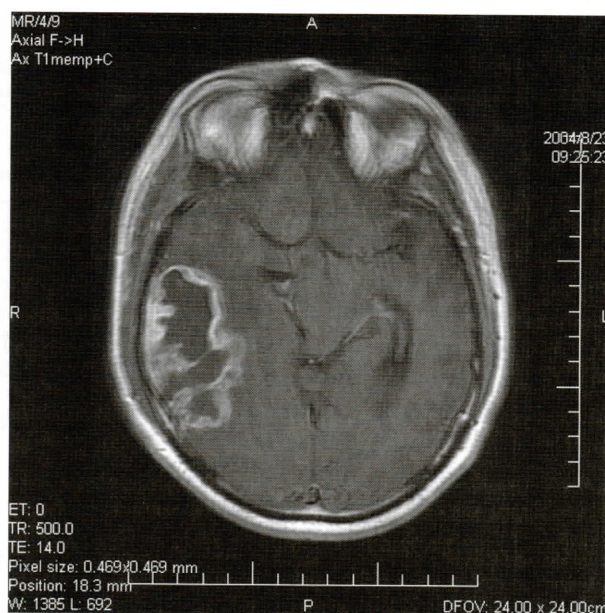
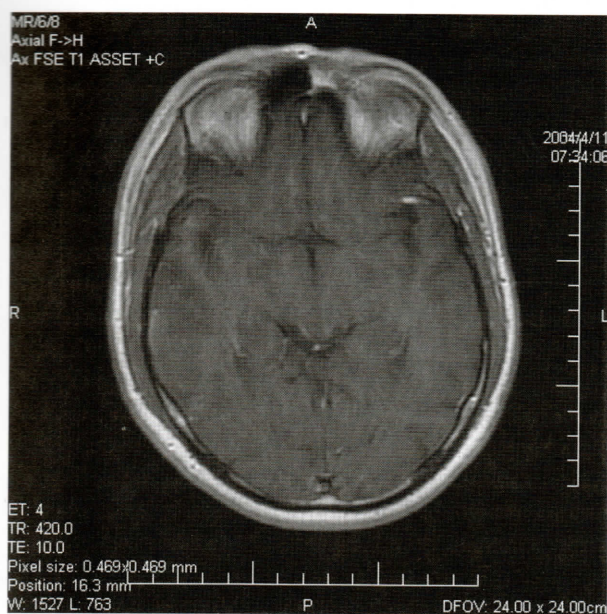
e-mail: filip.kramar@uvn.cz

Doručeno: 19. 1. 2006

Přijato do tisku: 30. 3. 2006

Podpořeno grantem IGA MZ NR

1A/8237-3 a výzkumným záměrem MZO 00064165



Obr. 1. Primární glioblastom, odstup mezi oběma vyšetřeními je čtyři měsíce. První vyšetření bylo provedeno po proběhlém epileptickém záchvatu.

ru je komplexní a vysoce variabilní (multiforme). Přestože současné poznatky vyvrátily jejich domněnku o původu nádoru v glioblastech, jejich histologické charakteristiky se příliš nezměnily. Na tomto příkladu vidíme, že určení typu nádoru na základě histologického obrazu se opírá o práce až 80 let staré. Přesto musíme vysoce ocenit jejich práci, protože přinesla určitý řád do, v té době, velice nejednotné klasifikace.

Mozkové gliomy jsou heterogenní skupinou primárních mozkových nádorů. Tvoří asi 40 % všech mozkových nádorů. Roční incidence u dospělých dosahuje cca 5,4 nových případů na 100 000 obyvatel. Nizkostupňové gliomy tvoří cca 10–20 % z tohoto množství. Incidence gliomů u dětí dosahuje 2,4 na 100 000 obyvatel, incidence low-grade gliomů je 0,6 na 100 000 obyvatel. U nizkostupňových gliomů se incidence ani ve světovém měřítku příliš neliší. U vysokostupňových gliomů se zdá, že je nižší v asijských zemích než v Evropě a Severní Americe (2, 3).

Astrocytární nádory jsou v současné době nejvíce studovanou skupinou nádorů mozku. Od roku 1985, kdy byla v glioblastomu (obr. 1) prokázána amplifikace *EGFR* genu (4), znalosti molekulárních mechanismů vzniku a průběhu gliomů značně pokročily. Dnes víme, že existuje primární a sekundární glioblastom, které se liší svým vývojem zahrnujícím abnormality odlišných genů. Vzhledem k důležitosti těchto cest v patogenezi nádorů musíme nejprve věnovat prostor jejich stručnému popisu.

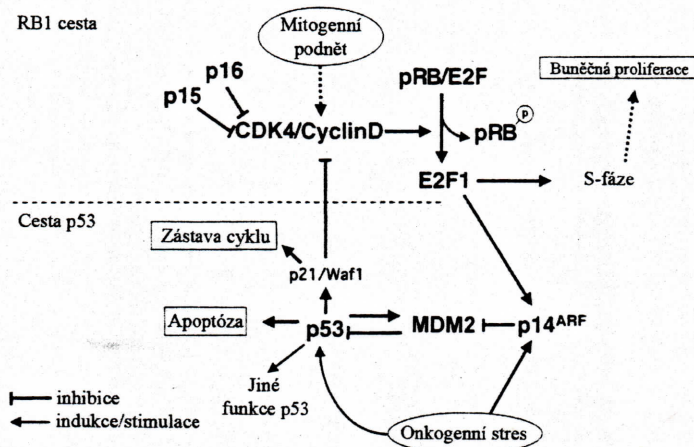
p53

Cesta p53 zahrnuje jednak protein p53, jednak další proteiny, které se podílí na regulaci hladiny p53. p53 se v buňce vyskytuje ve funkčním stavu jako homotetramerický komplex, který aktivuje velkou řadu genů včetně genů pro apoptózu (BAX) a inhibitorů RB1 cesty. Rovněž

transkripce *MDM2* genu je ovlivňována p53, MDM2 (mouse double minute 2 human homolog) protein je negativním regulátorem p53. p53 je spojen s RB1 cestou pomocí transkripčního faktoru E2F, který indukuje transkripci genu *CDKN2A* (alternativní přepis – vzniká p14^{ARF}). Protein p14^{ARF} inhibuje degradaci p53 pomocí MDM2 (štěpí protein MDM2) (5, 6). Zvýšená hladina p14^{ARF} zvyšuje hladiny p53, což vede ke zvýšení senzitivity cesty p53, a tím k indukci zástavy buněčného cyklu a k buněčné apoptóze. Pokud je buňka významně poškozena, může být nasměrována pomocí p53 k apoptóze. Tím je zastavena replikace poškozeného genomu.

RB1

RB1 cesta je regulační systém kontrolující fosforylaci RB1 proteinu (retinoblastoma 1) a následné uvolnění E2F transkripčních faktorů. Tato cesta plní hlavní úlohu v přestupu z G₁ do S fáze buněčného cyklu (7, 8, 9). Na podkladě mitogenních stimulů dochází ke zvýšené produkci cyklínů D (D1–D3) a ty se váží na CDK4 nebo CDK6 (cyklin-dependentní kinázy). Komplex CDK4 (CDK6)/cyklin D fosforyluje RB1 protein s uvolněním E2F transkripčních faktorů, což vede k aktivaci transkripce genů potřebných pro pokračování buněčného cyklu (zvl. cyklínu E). CDK4/cyklin D komplex je negativně regulován pomocí p16 (CDKN2A – cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) a p15 (CDKN2B), což jsou zástupci rodiny INK4 z CDK inhibitorů, které se specificky vážou k CDK4 a CDK6 přičemž kompetitivně ovlivňují jejich vazbu na cyklíny D. Jakákoli odchylka v mechanismu kontrolujícím fosforylaci RB1 proteinu či mutace *RB1* genu vede k neschopnosti rozštěpit E2F a tím k zvýšeným hladinám E2F transkripčních faktorů. Na druhou stranu ale dochází ke zvýšené citlivosti cesty p53 díky aktivaci p14^{ARF} a zvyšuje se hladina p53 cestou inhibice MDM2 aktivity (obr. 2).



Obr. 2. Signální cesty RB1 a p53 a jejich vzájemný vztah (upraveno podle Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. J Neurooncol 2004; 70: 137–60.) pRB – RB1 protein, pRBP – fosforylovaný RB1 protein.

Růstové faktory (GF), receptory růstových faktorů (GFR), cesta PI3-kináza/Akt

Třetí cesta, která bývá příčinou vzniku astrocytárních nádorů je PI3-kináza/Akt. Cesta PI3-kináza/Akt je komplexní a podílí se na přenosu signálu cestou receptorů růstových faktorů. Zvýšená exprese EGFR (epidermal growth factor receptor) či PDGFR- α (platelet-derived growth factor receptor alpha) je častým jevem. Dochází k ní nejčastěji amplifikací příslušného genu, ale též naopak při absenci amplifikace jiných zatím neznámých mechanismů (10, 11). Ligandy pro EGFR i PDGFR- α jsou exprimovány v nádorové tkáni a otevírají tak možnost stimulaci růstu jejich vazbou na normální receptory růstových faktorů (12, 13, 14, 15). Po vazbě ligandu EGFR či PDGFR- α dimerizuje a autofosforyluje intracelulární doménu, která pak navazuje adaptorové proteiny zavzaté v Ras/Raf/MAP kinázové cestě, a rovněž váže a aktivuje PI3-kinázu. PI3-kináza následně lokálně fosforyluje fosfatidylinositol-4,5-difosfát (PIP₂) na fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP₃). Hladina PIP₃ je kontrolována pomocí PTEN (fosfatázy kódované *PTEN* genem na 10q23), která defosforyluje PIP₃ zpět na PIP₂ (16). V případě absence PTEN (delece či mutace obou alel *PTEN*) dochází k akumulaci PIP₃. Na PIP₃ se váží proteiny s Pleckstrin homologními doménami (PH-domény) včetně Akt, PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) a PDK2. PDK (zatím byla určena pouze PDK2 na 17q21.33) jsou kinázy, které fosforylují Akt (rovněž kináza) nejméně na dvou místech, která prostorově sousedí. Fosforylovaná Akt je významný antiapoptotický faktor. Akt fosforyluje mnoho dalších proteinů včetně proteinů, které jsou součástí apoptotické cesty, a tím se stávají mnohem rezistentnější vůči aktivaci (17).

Invazivita růstu

Astrocytomy se v mozku šíří anatomickými strukturami bílé hmoty, především podél dlouhých drah (18). Vnitřní prostředí mozku je složeno z neuronů, gliálních elementů a extracelulárního prostoru. Součástí extracelulárního prostoru je i extracelulární matrix (ECM), tvořená strukturálními proteiny typu lamininu, kolagenu typu IV, fibronectinu a vitronectinu. Interakce astrocytomové buňky s elementy těchto proteinů navozuje invazivní růst. Podstatou interakce astrocytom-ECM je aktivace receptorů a růstových faktorů. Sem patří povrchové receptory – integriny a DCC (deleted in colorectal carcinoma), hyaluronátové receptory CD44, RHAMM a BEHAB, ontogenetický protein SPARC, a další známé faktory a jejich receptory: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFR- α , PDGFR- β , TGF- α , EGFR a bFGF (19, 20). Interakce ECM s aktivovanými růstovými faktory a receptory je výsledkem genetické aberace (overexprese, amplifikace, delece nebo mutace) a je podstatou urychlení astrocytomové invaze. Rozhodujícím místem pro invazi je okraj astrocytomu, kterým nádor penetruje do mozkové tkáně. V těchto místech je lokalizován tenascin (protein aktivující migraci). Další invazivita pak závisí hlavně na stupni exprese integrinů (povrchových buněčných receptorů), (21, 22).

Angiogeneze

Geneze astrocytomu a jeho progresu jsou vždy spojené s formováním cévního systému. Zatímco vaskularita nízkostupňových gliomů je velmi podobná normálnímu mozku, u maligních gliomů dochází k mikrovaskulární

proliferaci a výraznému zvýšení vaskularity oproti normálnímu mozku a nízkostupňovému gliomu (23). Patogeneze mikrovaskulární proliferace u glioblastomu vychází ze dvou odlišných patofyziologických mechanismů: (1) angiogeneze, (2) remodelace kapiláry zablokováním pericytů.

Angiogenezi rozumíme vznik nových endotelových buněk z existující kapilární sítě v normálním mozku. Angiogenezi regulují endoteliální tyrosinkinázy vazbou na jejich receptory, z nichž nejdůležitější jsou: VEGFR-1, VEGFR-2, Tie-1, Tie-2, PDGFR β , c-met a integriny (av β 3). Tyto receptory jsou v nádorových cévách přítomny ve zvýšené míře, zatímco za normálních okolností se prakticky nevyskytují (24, 25). Ukazuje se, že hlavní roli v angiogenezi hraje především VEGF (vascular endothelial growth factor), který se váže na VEGFR-1 a VEGFR-2 (26). VEGF je uvolňován přímo nádorovou buňkou v množství, které závisí na stupni malignity – čím malignější nádor, tím více je VEGF exprimován (23). VEGF však patří též mezi faktory, které výrazně zvyšují permeabilitu hematoencefalické bariéry. Exprese VEGF je výrazně utlumována dexametazonem, a tím je vysvětlen efekt tohoto kortikoidu v léčbě edému mozku u gliomů (27, 28).

Druhým mechanismem je remodelace kapiláry zablokováním pericytů. Pericyty jsou buňky hladké svaloviny a spolu s astrocyty tvoří integrální součást hematoencefalické bariéry. Jejich funkce je u astrocytomu regulována aktivací receptorů a ligandů jako jsou: Tie-2, PDGFR- β a TGF- β . Hlavní roli hraje Tie-2 receptor, jehož exprese endotelovou buňkou je výrazně zvýšena během progresu astrocytomu. Jeho agonista angiopoetin-1 je exprimován gliomovou buňkou, jeho antagonistu angiopoetin-2 je exprimován gliomovou cévou, a to ve výrazně větším množství (29). Angiopoetin-2 inhibuje funkci Tie-2, což se projeví především ztrátou podpůrných funkcí perivaskulárních elementů, především pericytů pro normální funkci endotelu. Tím se stává endotel přístupným pro působení indukčních faktorů angiogeneze, jako např. VEGF (30).

Apoptóza

Zánik buňky je zásadně možný dvěma zcela odlišnými mechanismy: nekrózou a apoptózou. Nekróza je patologický proces, vyvolaný většinou toxickým, tepelným či mechanickým zevním vlivem, který způsobí rozvrat iontové intracelulární homeostázy.

Apoptóza je fyziologický mechanismus. Je charakterizována kondenzací chromatinu, segmentací jádra, svinutím plazmatické membrány do vakovitých výběžků, kontrakcí jejich báze a postupným vytvořením tzv. apoptotických tělísek, obsahujících části cytoplazmy a fragmenty jádra. Tělíška jsou postupně fagocytována makrofágy nebo funkčně obdobnými buňkami. Z biochemického hlediska je apoptóza zahájena aktivací Ca²⁺-

Mg²⁺-dependentní endonukleázy, což vede k degradaci jaderné genomové DNA na oligonukleosomové fragmenty. Fragmentace DNA následně vede k poklesu syntézy RNA a proteinů.

Apoptóza je považována za důležitý biologický regulační mechanismus, který hraje klíčovou roli v regulaci počtu buněk jednotlivých tkání a orgánů. Procesem apoptózy jsou za fyziologických okolností odstraňovány buňky nadbytečné nebo buňky poškozené genetickými defekty, stárnutím, nemocí nebo expozicí různými noxami. Za patologických okolností je dysregulace apoptózy základem pro vznik a progresi různých klinických patologických jednotek. Ve vztahu k apoptóze je především studována rodina proteinu Bcl-2, jejíž název je odvozen od proteinu, který byl jedním z prvních nalezených onkogenů u lymfomů vycházejících z B lymfocytů (B-cell CLL/lymphoma 2). V současnosti je známo přes 20 proteinů této rodiny, které působí jako inhibitory apoptózy (např. Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w) i aktivátory (např. Bax, Bak, Bok). Proteiny rodiny Bcl-2 se vyskytují především v zevní membráně mitochondrií a ovlivňují aktivaci caspáz řízeným uvolňováním cytochromu c z intermembránového prostoru mitochondrie. Zatímco inhibitory apoptózy zabraňují translokaci cytochromu c do cytoplasmu, aktivátory apoptózy tento transport stimulují. Uvolnění cytochromu c umožňuje aktivaci Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) a procaspázy 9, tento funkční celek bývá též označován názvem „apoptozom“. Uvolněná caspáza 9 pak aktivuje procaspázu 3 a apoptóza se dostává do své efektorové fáze. Mechanismy apoptózy mají úzký vztah k chemoterapii a radioterapii gliomů.

Porucha buněčných cest, růstových faktorů a receptorů růstových faktorů v astrocytárních gliomech u dospělých

U difuzních astrocytomů (WHO grade II) nacházíme pouze poruchu cesty p53. U většiny anaplastických astrocytomů (WHO grade III) je situace podobná, ale malá část z nich se podobá glioblastomům (WHO grade IV). U glioblastomů je vedle poruchy cesty p53 přítomná i porucha cest RB1 a PI3-kináza/Akt. Mutace *TP53* (tumor protein p53) genu je nalézána u astrocytárních nádorů všech stupňů malignity. Gen *TP53* je mutován v 40–70 % difuzních astrocytomů a anaplastických astrocytomů, ale pouze ve 30–40 % glioblastomů (31). *CDK4* a *MDM2* se nacházejí v relativně malém úseku chromozomu 12 (12q13-15), cca 11 Mb. K amplifikaci této oblasti dochází zhruba ve 13 % glioblastomů a 8 % anaplastických astrocytomů. Ačkoli se v sousedství nachází mnoho dalších genů a někdy jsou dokonce zavzaty v amplikonu, nejsou zvýšeně exprimovány. V některých tumorech jsou tyto další geny z amplikonu následně vyňaty. *CDK4* je v amplikonu zavzat prakticky vždy, ale k jeho overexpresi vždy nedochází. *MDM2* není v amplikonu sice vždy, ale pokud je zavzat, je vždy overexprimován (32, 33). Vzestup *CDK4* vede k překonání regulace pomocí inhibičních p15 a p16 (produkty *CDKN2A* a *CDKN2B*). Volný *CDK4* a *CDK6* se pak

vážou na cykliny D1/D3. Overexprese *MDM2* vede ke zvýšené degradaci p53, přičemž opět překonává inhibiční účinek p14^{ARF}. Koamplifikace/overexprese těchto dvou genů vede k současnému přerušení obou cest, p53 i RB1. Byla rovněž popsána amplifikace *MDM4*, homologue *MDM2* (33).

CDKN2A a p14^{ARF} (kódují p16 a p14^{ARF}) jsou kódovány na stejném lokusu (9p21). Produkty těchto genů jsou přepisovány z odlišných promotorů a prvních exonů (exon 1α a 1β), ale sdílí stejný exon 2 a 3, přičemž používají odlišný čtecí rámec pro translaci. *CDKN2B* je lokalizován pouze o 11kb směrem k centroměře od lokusu pro *CDKN2A/p14^{ARF}*. Tento úsek chromozomu 9 bývá deletován nejméně ve 30–40 % glioblastomů a cca v 10 % anaplastických astrocytomů. Ztrátou obou alel *CDKN2A/B* a p14^{ARF} tak dochází k přerušení cesty p53 i RB1 (34, 35). Incidence ztráty jedné alely a somatické mutace druhé je u těchto genů popisována relativně méně často. Dochází tak opět k přerušení obou cest. V některých nádorech může být transkripce zastavena díky hypermethylaci promotorového úseku zbývající divoké alely. Doposud nebyla popsána žádná mutace v genu pro *CDKN2B* (34, 36).

Protein p27 se podílí na regulaci buněčného cyklu v kontrolním bodě G1. Je produktem genu *CDKN1B* na 12p13.1-p12. Inhibuje komplex cyklin-CDK (cyklin D-CDK4, cyklin E-CDK2, cyklin A-CDK2). *CDKN1B* sdílí určitou podobnost s *CDKN1A*. Exprese p27 je snížena u maligních gliomů a některých karcinomů. Imunohistochemické studie prokázaly vysokou expresi p27 u difuzních astrocytomů Gr. II, ale výrazně sníženou u anaplastických astrocytomů a glioblastomů.

Mutace nebo homozygotní delece *RB1* genu (13q14) je nejčastěji nalézána u glioblastomu (13%) (32). Hypermethylaci *RB1* promotoru, která blokuje transkripci genu, nacházíme v 25 % glioblastomů (37).

Poruchy jiných součástí těchto signálních cest byly rovněž nalezeny, ale v podstatně méně případech. Byly popsány amplifikace *CDK6* (7q21-22) (38), dále *CCND1* (gen kódující cyklin D1 – 11q13) nebo *CCND3* (kóduje cyklin D3) v glioblastomu či anaplastickém astrocytomu (39).

Ve velké většině nádorů je každá signální cesta přerušena jednou genetickou abnormalitou. Ve skutečnosti je možné říci, že u všech nádorů s poruchou RB1 cesty je přítomna i porucha cesty p53. Poruchy cesty p53 jsou u glioblastomů nalézány v 76 %, RB1 cesty v 67 %. U difuzních astrocytomů není RB1 cesta přerušena vůbec, cesta p53 je ale přerušena v 67 %. U anaplastických astrocytomů je porucha p53 přítomna v 72 %, RB1 ve 13 % (31).

Ve všech astrocytárních nádorech byla nalezena vysoká exprese PDGF ligandů, naznačující přítomnost autokrinní/parakrinní stimulace. Intracerebrální aplikace retroviru obsahujícího *PDGFR-bbb* vedla u myši ke vzniku glioblastomu, což naznačuje zapojení PDGF systému v patogenezi astrocytomů (40). Přesto overexprese není spojena s amplifikací (výjimkou je amplifika-

ce *PDGFR*, genu pro receptor PDGF-α, popsaná v malém procentu u glioblastomů). PDGF i PDGFR jsou často overexprimovány v astrocytomech. Delece *TP53* je velmi úzce spjata s overexpresí PDGFR-α, což může znamenat, že mutace *TP53* má onkogenní efekt především ve spojení s overexpresí PDGFR-α. Z dalších růstových faktorů a receptorů se v onkogenezi astrocytomů uplatňují FGF (Fibroblast Growth Factor) a VEGF (41).

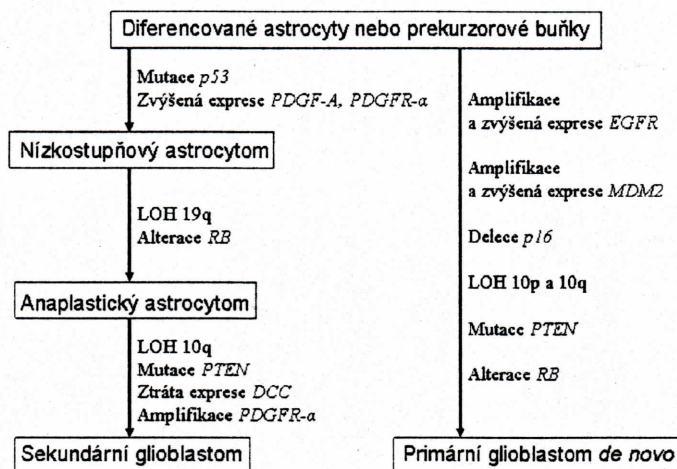
DCC gen je lokalizován na chromozomu 18q21 a kóduje transmembránový protein, který funguje jako receptor na povrchu buňky. *DCC* je v nervovém systému exprimován ve velkém množství a jeho produkty tvoří komponenty receptoru pro netrin-1. Netriny hrají důležitou roli v průběhu ontogeneze CNS (42). Imunohistochemická vyšetření prokazují, že exprese *DCC* klesá v průběhu progresu od nízkostupňových astrocytomů (7 %) ke glioblastomu (47 %). *DCC* indukuje apoptózu a zástavu buněčného cyklu v kontrolním bodě G2.

První genetickou abnormalitou nalezenou v gliomech byla amplifikace genu *EGFR* (7p11-12). Tato amplifikace je detekována v cca 35 % glioblastomů a v malé části anaplastických astrocytomů. Pokud je gen amplifikován, je vždy zvýšeně exprimován. Tato overexprese může být u glioblastomu ale přítomna i bez amplifikace (cca 15 %). Amplikon je často velký (nejméně 1,5 Mb) a vyskytuje se ve formě double minutes (acentrické dvojité struktury chromatinu) (43). V některých nádorech se vyskytují amplikony s geny, které přiléhají k *EGFR* genu, ale samotný gen *EGFR* tento amplikon neobsahuje, což by mohlo znamenat, že v tomto regionu jsou jiné geny, které spolupodpovídají za patogenezi tumoru jako v případě dlouhých ramen chromozomu 12(12q), kde jsou amplifikovány *CDK4* a *MDM2*, a to buď samostatně, nebo společně. Přestavba samotného genu se vyskytuje zhruba v polovině případů amplifikace *EGFR*, a to pouze v amplifikovaných kopiích (14). Nejčastěji se vyskytující přestavbou je aberantní spojení při transkripci, které vede ke ztrátě 267 aminokyselin extracelulární domény, která není schopna vázat ligand a receptor je trvale aktivován (14, 15). Vedle toho se ale vyskytují přestavby intracelulární domény EGF receptoru, i když méně často. Tyto přestavby (extra i intracelulární domény) se mohou vyskytovat ve stejném nádoru.

Mismatch repair geny (MMR), mikrosatelitová instabilita

Mikrosatelity jsou tvořeny opakovanými krátkými sekvencemi – repetitivy (dvou nebo více nukleotidů). Během replikace DNA může dojít v tomto úseku k přesmyku a výsledkem je nadpočetné množství těchto repetitiv, které musí být odstraněny pomocí MMR genů, jinak jejich počet kolísá během každého buněčného cyklu. Porucha MMR genů (*hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* a *hPMS2*) vede k tzv. mikrosatelitové instabilitě

Vývoj primárního a sekundárního glioblastomu



Obr. 3. Vývoj primárního a sekundárního glioblastomu (upraveno podle KLEIHUES, P., CAVENEE, W.K. eds.: World Health Organisation classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000).

(mutace, delece, hypermethylace promotoru) na mnoha místech. U sporadických gliomů nacházíme mikrosatelitovou instabilitu pouze zřídka. U malé části astrocytomů vzniklých v dětském věku byla ale mikrosatelitová instabilita nalezena.

Genetické abnormality zatím nezjištěných genů

Vedle doposud popsaných genů byly v astrocytárních nádorech zjištěny mnohé další odchylky v mnoha chromozomových oblastech, kde je předpokládán výskyt nového tumor-supresorového genu či onkogenu. Některé z těchto numerických a strukturních abnormalit se vyskytují častěji než ostatní (6q23-27, 9p21-24, 10, 13p11-13, 13q14-34, 22, polysomie 7) (44). Komparativní genomová hybridizace pak prokázala ještě více chromozomových aberací (1p22, 4q33-35, 6q16, 9p21, 10q25-26, 13q21, 22q13, dále 1p36, 3q26-27, 7p12, 7q21-31, 8q24, 12p13, 12q13-15, 17q24, 19q13, 20q13) (45).

U části astrocytomů byla opakovaně pozorována delece 6q s incidencí až 40 % u anaplastických astrocytomů a glioblastomů. Tato delece je detekována i u jiných nádorů, např. karcinomů prsu. Zmnožení části či celého chromozomu 7 je jednou z nejčastějších chromozomových odchylek astrocytárních nádorů. Byla pozorována až u 60 % glioblastomů, a to s či bez-amplifikace *EGFR* (46).

Delece chromozomu 10 je zdaleka nejčastější abnormalitou u glioblastomů. Deleci nalézáme u 70–90 % glioblastomů, ve většině případů jako monosomii chromozomu 10. Méně často je přítomna i u anaplastických astrocytomů a difuzních astrocytomů. Nicméně pouze

u 50 % glioblastomů s delecí chromozomu 10 nacházíme zároveň mutaci *PTEN* (tumor-supresorový gen *PTEN* (*MMAC1/TEP1*), 10q23-24). Proto existuje předpoklad ještě dalšího tumor-supresorového genu v oblasti 10q. *MXI1* je negativním regulátorem onkoproteinu *MYC*, v experimentu je schopen zastavit růst buněčné kultury glioblastomu U87MG. Je lokalizován na 10q25.2. Doposud ale nebyla v glioblastomu nalezena jeho mutace (47, 48). *DMBT1* (deleted in malignant brain tumours) je dalším genem, který byl nalezen v glioblastomech a medulloblastomech homozygotně deletován. Další výzkum ale zjistil, že některé oblasti genu jsou vysoce nestabilní a homozygotní delecí byl odhalen polymorfismus příslušného genu (49).

Existuje mnoho prací, které se zabývají oblastmi 10p a které podporují možnost, že tato oblast hraje podstatnější úlohu v patogenezi astrocytárních nádorů. *KLF6* (Kruppel-like factor 6, prostate adenocarcinoma-1) je gen, který kóduje transkripční faktor mutovaný u karcinomu prostaty, lokalizovaný v oblasti 10p15. Jeho mutace byla ale nalezena rovněž v astrocytomech všech stupňů malignity (50). Gen se nenachází v žádné běžně deletované oblasti.

V astrocytomech jsou často rovněž deletována dlouhá ramena chromozomu 22 (del 22q). *NF2* je gen mutovaný u neurofibromatózy II. typu a rovněž u sporadických meningiomů a schwannomů. V současné době se nepředpokládá, že by se tento gen podílel na patogenezi astrocytárních nádorů. V oblasti 22q se nachází ještě gen *CHEK2* (CHK2 checkpoint homolog (*S. pombe*)), který se podílí na přechodu z G2 do M fáze buněčného cyklu. Jeho mutace byla nalezena v rodinách s Li-Fraumeni syndromem, u kterých nebyla nalezena germinální mutace *TP53* (51). Nicméně v astrocytomech mutace *CHEK2* nalezena nebyla.

Molekulární analýza genové eprese pomocí mikročipů, expresní profilování

Přestože studií astrocytárních nádorů využívajících mikročipy je prozatím málo, přesto přinesly některé zajímavé poznatky. Jednak potvrdily předchozí pozorování (zapojení růstových faktorů v tumorigenezi glioblastomů), jednak ukázaly, že exprese mRNA se liší ve zdravé a nádorové tkáni u různých typů nádorů a jejich stupňů (52, 53). Některé z těchto studií ukázaly, že astrocytární tumory vykazují abnormality i jiných genů, a to buď ve smyslu overexprese, nebo je naopak exprese určitých genů potlačena. Při porovnání vzorků tkáně z 11 difuzních astrocytomů s normální mozkovou tkání bylo nalezeno 6 genů, které byly exprimovány pouze v nádorové tkáni (*TIMP3*, *MYC*, *EGFR*, *DR-nm23*, *nm23-H4* a *GDNPF*). Sedm genů bylo exprimováno v minimálně dvojnásobném množství oproti normě (*AAD14*, *SPARC*, *LRP*, *PDGFRA*, 60S ribozomální protein L5, *PTN* a *hBAP*) a 11 genů bylo naopak exprimováno v minimálně polovičním množství oproti normě (*IFI 9-27*, protein-kináza *CLK*, *TDGF1*, *BINI*, *GABI*, *TYRO3*, *LDH-A*, *adducin 3*, *GUK1*, *CDC10* a *KRT8*) (53). V dalších pracích byly popsány změny v regulaci mnoha dalších genů. Série z roku 2003 při analýze difuzních astrocytomů, které později progredovaly v anaplastický astrocytom či glioblastom, prokázala významnou změnu v hodnotách transkripce u 66 genů (54).

Genetické abnormality a jejich souvislost s klinicko-patologickým obrazem astrocytárních nádorů

Primární a sekundární glioblastom

Většina glioblastomů vzniká velmi rychle, bez předchozích známek méně maligní léze. Jsou označovány jako de novo glioblastomy. Anamnéza je většinou velmi krátká (méně než 3 měsíce). Při MR vyšetření mozku nacházíme patologické ložisko s centrální nekrózou a okolním enhancujícím lemem a výrazným kolaterálním edémem. Primární glioblastomy vznikají většinou u starších pacientů (stř. věk 55 let). Pravidelně jsou detekovány homozygotní delece *CDKN2A*, *CDKN2B* a *p14^{ARF}* v oblasti 9p nebo amplifikace *CDK4* často společně s *MDM2* na 12q. Tyto genetické změny vedou k přerušení signálních cest p53 i RB1. Obě cesty ale mohou být přerušeny najednou i samostatnou amplifikací regionu 12q (*CDK4* a *MDM2*). U více než 90 % primárních glioblastomů nacházíme monosomii chromozomu 10, a u 50 % je zjištěna mutace ve zbývajícím *PTEN* genu. Amplifikace genu *EGFR* nastává zhruba v 35 %, u další části není přítomna amplifikace, ale nechybí overexprese.

Sekundární glioblastomy vznikají pomalu progresí difuzního či anaplastického astrocytomu. Tyto gliobla-

stomy postihují mladší jedince (stř. věk 40 let) a typicky je přítomna delece a/nebo mutace s postižením obou alel *TP53*. Z dalších časných abnormalit je často zjištěna hypermethylace promotoru *p14^{ARF}* (55, 56). RB1 signální cesta je rovněž přerušena díky postižení obou kopií *RB1* genu. V méně případech je nalezena delece 10q, ale zbývajícím *PTEN* gen mutován nebývá. Pouze vzácně se vyskytuje amplifikace *EGFR* či *CDK4* (57, 58) nebo homozygotní delece *CDKN2A* a *p14^{ARF}* (57, 59) (obr. 3).

Vzácnější varianty glioblastomu

Obrovskobuněčný glioblastom (giant cell glioblastoma) je vzácná varianta glioblastomu charakterizovaná bizarními mnohojadernými obrovskými buňkami. Vzniká de novo, ale je charakterizován vysokou frekvencí výskytu mutace genu *TP53* (60, 61). Prognóza a přežití se neliší od běžného typu glioblastomu. Gliosarkom je další vzácnou jednotkou, která je charakterizována gliální a mezenchymální morfologií. Postihuje stejnou věkovou skupinu jako běžný glioblastom, rovněž prognóza i nacházené mutace se neliší. Jsou identické v gliální i mezenchymální složce nádoru (62, 63).

Pilocytický astrocytom

Jedná se o jediný astrocytární nádor označovaný WHO stupněm I. Nejčastější výskyt je v mozečku a optickém nervu (gliom optiku) u dětí. Pokud je nádor radikálně odstraněn, je prognóza velmi dobrá. Nicméně i u partiálních resekcí může být stav stabilizován po mnoho let. Zvýšená incidence pilocytického astrocytomu, zvláště pak gliomu optiku, je součástí klinického a morfologického obrazu neurofibromatózy typu I (64). Velmi vzácně může i pilocytický astrocytom progredovat do maligních forem astrocytomů. Několik molekulárně genetických analýz detekovalo v některých případech mutaci *TP53*, mutace *NF1* nebyla u sporadických nádorů nalezena (65, 66). V současné době existují náznaky, že i v případech pilocytických astrocytomů může být v některých případech přítomna hypermethylace promotoru u některých genů (66, 67).

Pleomorfní xanthoastrocytom

Tento nádor se rovněž nejčastěji vyskytuje u dětí a mladších jedinců. Nejčastěji vyrůstá kortikálně v mozkových hemisférách, může být cystický. Proliferační index bývá nízký (pod 1%). Ve WHO klasifikaci tento nádor dosahuje stupně II. Jeho prognóza je příznivější, mnoho nemocných přežívá řadu let. Existuje i varianta se zvýšenou mitotickou aktivitou, přítomností nekróz a rychlejší progresí. Bývá označován jako pleomorfní xanthoastrocytom s anaplastickými rysy, WHO stupeň III (68). O genových abnormalitách v pleomorfním astrocytomu toho mnoho známo není, v některých případech byla zjištěna mutace *TP53*, v jednom případě recidivujícího nádoru dokonce amplifikace *EGFR*.

1. **Bailey P, Cushing HA** Classification of Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis. Philadelphia: Lippincott; 1926.
2. **Fleury A, Menegoz F, Grosclaude P, Daures JP, Henry-Amar M, Raverdy N, et al.** Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in France. *Cancer* 1997; 79: 1195–202.
3. **Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS.** Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-oncol*; 4: 278–99.
4. **Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, et al.** Amplification and overexpression of the EGF receptor gene in primary human glioblastomas. *J Cell Sci* 1985; 3 (Suppl): 161–72.
5. **Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, et al.** p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 1998; 395: 124–5.
6. **Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG.** ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 1998; 92: 725–34.
7. **Pines J.** The cell cycle kinases. *Semin Cancer Biol* 1994; 5: 305–13.
8. **Lundberg AS, Weinberg RA.** Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1886–94.
9. **Sherr CJ, Roberts JM.** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501–12.
10. **Fleming TP, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Oldfield EH, Aaronson SA, et al.** Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res* 1992; 52: 4550–3.
11. **Chaffanet M, Chauvin C, Laine M, Berger F, Chedin M, Rost N, et al.** EGF receptor amplification and expression in human brain tumours. *Eur J Cancer* 1992; 28: 11–7.
12. **Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP.** Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 8602–6.
13. **Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, et al.** Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 2965–9.
14. **Ekstrand AJ, Longo N, Hamid ML, Olson JJ, Liu L, Collins VP, et al.** Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene* 1994; 9: 2313–20.
15. **Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cave-nee WK, et al.** A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 7727–31.
16. **Maehama T, Dixon JE.** The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998; 273(22): 13375–8.
17. **Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C.** PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 2003; 22: 8983–98.
18. **Giese A, Westphal M.** Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* 1996; 39: 235–50.
19. **Knott JC, Mahesparan R, Garcia-Cabrera I, Bolge Tysnes B, Edvardsen K, Ness GO, et al.** Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells. *Int J Cancer* 1998; 75: 864–72.
20. **Noble M, Mayer-Proschel M.** Growth factors, glia and gliomas. *J Neurooncol* 1997; 35: 193–209.
21. **Carnemolla B, Castellani P, Ponassi M, Borsi L, Urbini S, Nicolo G, et al.** Identification of a glioblastoma-associated tenascin-C isoform by a high affinity recombinant antibody. *Am J Pathol* 1999; 154: 1345–52.
22. **Giese A, Loo MA, Norman SA, Treasurywala S, Berens ME.** Contrasting migratory response of astrocytoma cells to tenascin mediated by different integrins. *J Cell Sci* 1996; 109: 2161–8.
23. **Plate KH, Breier G, Risau W.** Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol* 1994; 4: 207–18.
24. **Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, et al.** Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J Clin Invest* 1993; 91: 153–159.
25. **Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W.** Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; 359: 845–8.
26. **Cheng SY, Huang HJ, Nagane M, Ji XD, Wang D, Shih CC, et al.** Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8502–7.
27. **Heiss JD, Papavassiliou E, Merrill MJ, Nieman L, Knightly JJ, Walbridge S, et al.** Mechanism of dexamethasone suppression of brain tumor-associated vascular permeability in rats. Involvement of the glucocorticoid receptor and vascular permeability factor. *J Clin Invest* 1996; 98: 1400–8.
28. **Machein MR, Kullmer J, Fiebich BL, Plate KH, Warnke PC.** Vascular endothelial growth factor expression, vascular volume, and capillary permeability in human brain tumors. *Neurosurgery* 1999; 44: 732–41.
29. **Stratmann A, Risau W, Plate KH.** Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 153: 1459–66.
30. **Lauren J, Gunji Y, Alitalo K.** Is angiopoietin-2 necessary for the initiation of tumor angiogenesis? *Am J Pathol* 1998; 153: 1333–9.
31. **Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP.** Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res* 2000; 60: 417–24.
32. **Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J, Elkahoul AG, Meltzer PS, Collins VP.** Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res* 1996; 56: 5141–5.
33. **Riemenschneider MJ, Buschges R, Wolter M, Reifenberger J, Bostrom J, Kraus JA, et al.** Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification. *Cancer Res* 1999; 59: 6091–6.
34. **Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, et al.** Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 1994; 54: 6353–8.
35. **Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN.** CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 1996; 56: 150–3.
36. **Schmidt EE, Ichimura K, Messerle KR, Goike HM, Collins VP.** Infrequent methylation of CDKN2A(MTS1/p16) and rare mutation of both CDKN2A and CDKN2B(MTS2/p15) in primary astrocytic tumours. *Br J Cancer* 1997; 75: 2–8.
37. **Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.** Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest* 2001; 81: 77–82.
38. **Costello JF, Plass C, Arap W, Chapman VM, Held WA, Berger MS, et al.** Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res* 1997; 57(7): 1250–4.
39. **Buschges R, Weber RG, Actor B, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G.** Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol* 1999; 9: 435–42; discussion 432–3.
40. **Uhrbom L, Hesselager G, Nister M, Westermark B.** Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus. *Cancer Res* 1998; 58: 5275–9.
41. **Westermark B, Heldin CH, Nister M.** Platelet-derived growth factor in human glioma. *Glia* 1995; 15: 257–63.
42. **Meyerhardt JA, Caca K, Eckstrand BC, Hu G, Lengauer C, Banavali S, et al.** Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas. *Cell Growth Differ* 1999; 10: 35–42.
43. **Bigner SH, Wong AJ, Mark J, Muhlbauer LH, Kinzler KW, Vogelstein B, et al.** Relationship between gene amplification and chromosomal deviations in malignant human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 29: 165–70.
44. **Mertens F, Johansson B, Hoglund M, Mitelman F.** Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic sur-

- vey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 1997; 57: 2765–80.
45. Koschny R, Koschny T, Froster UG, Krupp W, Zuber MA. Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 135: 147–59.
 46. Liu L, Ichimura K, Pettersson EH, Collins VP. Chromosome 7 rearrangements in glioblastomas; loci adjacent to EGFR are independently amplified. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 1138–45.
 47. Albarosa R, Colombo BM, Roz L, Magnani I, Pollo B, Cirenei N, et al. Deletion mapping of gliomas suggest the presence of two small regions for candidate tumor-suppressor genes in a 17-cM interval on chromosome 10q. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1260–7.
 48. Fults D, Pedone CA, Thompson GE, Uchiyama CM, Gumpert KL, Iliev D, et al. Microsatellite deletion mapping on chromosome 10q and mutation analysis of MMAC1, FAS, and MXI1 in human glioblastoma multiforme. *Int J Oncol* 1998; 12: 905–10.
 49. Pang JC, Dong Z, Zhang R, Liu Y, Zhou LF, Chan BW, et al. Mutation analysis of DMBT1 in glioblastoma, medulloblastoma and oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 2003; 105: 76–81.
 50. Jeng YM, Hsu HC. KLF6, a putative tumor suppressor gene, is mutated in astrocytic gliomas. *Int J Cancer* 2003; 105: 625–9.
 51. Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, et al. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999; 286: 2528–31.
 52. Kim S, Dougherty ER, Shmulevich I, Hess KR, Hamilton SR, Trent JM, et al. Identification of combination gene sets for glioma classification. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 1229–36.
 53. Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res* 2000; 60: 6868–74.
 54. Van den Boom J, Wolter M, Kuick R, Misek DE, Youkilis AS, Wechsler DS, et al. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 2003; 163: 1033–43.
 55. Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, et al. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 523–30.
 56. Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers L, Oberstrass J, An HX, et al. Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 822–31.
 57. Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997; 94: 303–9.
 58. Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996; 6: 217–23; discussion 23–4.
 59. Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, et al. p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* 2001; 11: 159–68.
 60. Peraud A, Watanabe K, Schwechheimer K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Genetic profile of the giant cell glioblastoma. *Lab Invest* 1999; 79: 123–9.
 61. Meyer-Puttlitz B, Hayashi Y, Waha A, Rollbrocker B, Bostrom J, Wiestler OD, et al. Molecular genetic analysis of giant cell glioblastomas. *Am J Pathol* 1997; 151: 853–7.
 62. Reis RM, Konu-Leblebicioglu D, Lopes JM, Kleihues P, Ohgaki H. Genetic profile of gliosarcomas. *Am J Pathol* 2000; 156: 425–32.
 63. Biernat W, Aguzzi A, Sure U, Grant JW, Kleihues P, Hegi ME. Identical mutations of the p53 tumor suppressor gene in the gliomatous and the sarcomatous components of gliosarcomas suggest a common origin from glial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 651–6.
 64. Listernick R, Charrow J, Gutmann DH. Intracranial gliomas in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet* 1999; 89: 38–44.
 65. Kluwe L, Hagel C, Tatagiba M, Thomas S, Stavrou D, Oster-tag H, et al. Loss of NF1 alleles distinguish sporadic from NF1-associated pilocytic astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 917–20.
 66. Patt S, Gries H, Giraldo M, Cervos-Navarro J, Martin H, Janisch W, et al. p53 gene mutations in human astrocytic brain tumors including pilocytic astrocytomas. *Hum Pathol* 1996; 27(6): 586–9.
 67. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Lomas J, Arjona D, Alonso ME, Aminoso C, et al. Epigenetic changes in pilocytic astrocytomas and medulloblastomas. *Int J Mol Med* 2003; 11: 655–60.
 68. Giannini C, Scheithauer BW, Burger PC, Brat DJ, Wollan PC, Lach B, et al. Pleomorphic xanthoastrocytoma: what do we really know about it? *Cancer* 1999; 85: 2033–45.

Správné odpovědi na vědomostní test k Minimonografii ČSNN 5/06: Pokročilá diagnostika a chirurgická léčba epilepsie

1 A, 2 D, 3 B, 4 C, 5 B, 6 B, 7 D, 8 A, 9 A, 10 B, 11 C, 12 C, 13 B, 14 A, 15 B, 16 A,
17 D, 18 A, 19 B, 20 D

Patogeneze mozkových gliomů, II. část: Patogeneze oligodendrogliomů a gliomů v rámci dědičných onemocnění

Kramář F.¹, Zemanová Z.², Michalová K.², Babická L.², Ransdorfová Š.², Kozler P.¹, Netuka D.¹

¹Neurochirurgická klinika I. LF UK, IPVZ a ÚVN, Praha

²Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a I. LF UK, Praha

✉ Korespondující autor:

MUDr. Filip Kramář

Neurochirurgická klinika I LF UK
Ústřední vojenská nemocnice,
U vojenské nemocnice 1200,
169 02 Praha 6

e-mail: filip.kramar@uvn.cz

Přijato k recenzi: 19. 1. 2006

Přijato do tisku: 30. 3. 2006

Podpořeno grantem IGA MZ NR
1A/8237-3 a výzkumným zámě-
rem MZO 00064165

Souhrn

V první části byly nastíněny patologické procesy v mozkových nádorech na úrovni genomu a popsány konkrétní chromozomální odchylky v astrocytárních nádorech. Druhá část je zaměřena na změny odehrávající se v oligodendroglálních nádorech a gliálních nádorech v rámci dědičných onemocnění.

Klíčová slova: gliom, oligodendrogliom, oligoastrocytom, ependymom, Li-Fraumeni syndrom, neurofibromatóza

Summary

Kramář F., Zemanová Z., Michalová K., Babická L., Ransdorfová Š., Kozler P., Netuka D.: Pathogenesis of Cerebral Gliomas, Part II: Pathogenesis of Oligodendrogliomas and Gliomas within Hereditary Disorders

Pathological processes within cerebral tumors at the level of genome were outlined and specific chromosomal deviations in astrocytic tumors were described in Part I. Part II deals with the changes taking place in oligodendroglial and glial tumors within hereditary disorders.

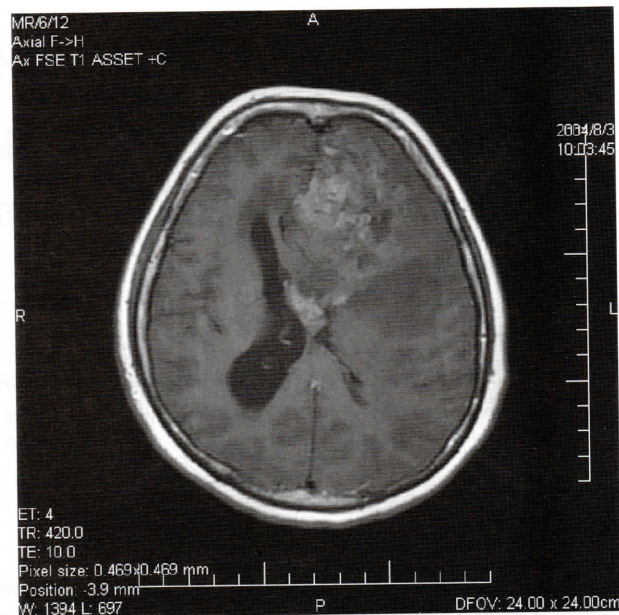
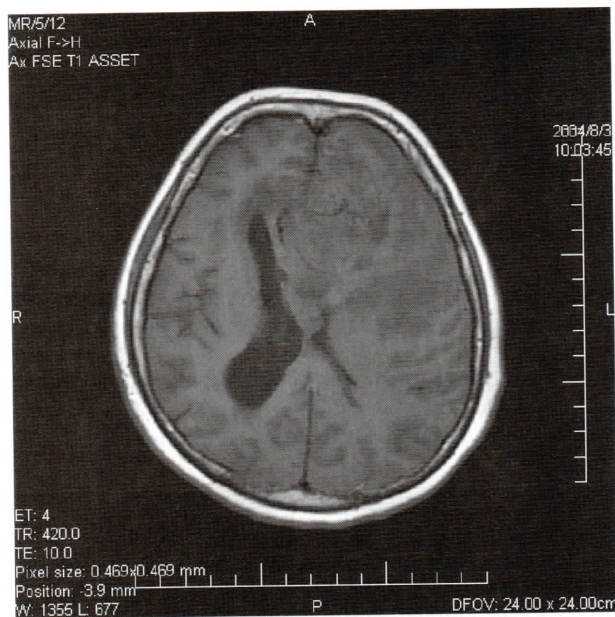
Key words: glioma, oligodendroglioma, oligoastrocytoma, ependymoma, Li-Fraumeni syndrome, neurofibromatosis

V první části byly nastíněny základní buněčné cesty, které se podílejí v tumorigenezi astrocytomů. Tato část je zaměřena na genetické změny v oligodendroglíomech a dědičná onemocnění, v rámci kterých se vyskytují gliální nádory.

Oligodendroglální nádory

Oligodendroglíomy vychází z oligodendrocytů. Vyskytují se jednak ve formě oligodendroglíomu WHO gr. II, nebo ve formě jeho malignější varianty – anaplastického oligodendroglíomu WHO gr. III (obr. 1). Od astrocytárních nádorů se odlišují především svojí chemosenzitivitou a poněkud lepší prognózou.

U oligodendroglálních nádorů je nejčastěji zjištěnou aberací delece 1p (p-krátké rameno chromozomu) a 19q (q-dlouhé rameno chromozomu). Ve většině případů se tyto delece vyskytují společně v rámci jednoho tumoru, mají zřejmě synergický účinek a postihují zpravidla celé rameno chromozomu. U oligodendroglíomů se vyskytuje ztráta heterozygoty (LOH) 1p až ve 100 %, LOH 19q v 88 % a kombinovaná LOH 1p/19q rovněž cca v 88 % (1, 2). U oligoastrocytomů (smíšených nádorů s oligodendroglální složkou) se LOH



Obr. 1. Anaplastický oligodendrogliom gr. III frontálně F vlevo.

1p vyskytuje v 19–100 %, LOH 19q v 14–75 % (1–4). Toto velké rozmezí je dáno především poněkud vágní histologickou interpretací oligoastrocytomů.

Při hodnocení genetických abnormalit v oligodendrogliálních nádorech pomocí CGH je frekvence detekce LOH 1p a 19q u oligodendrogliomů 79 % pro 1p a 74 % pro 19q. U oligoastrocytomů se LOH 1p vyskytuje pouze v 25 % a LOH 19q pouze ve 30 %. Předpokládá se, že ztráta 1p a 19q je časnou událostí v onkogenezi oligodendrogliomu. V některých nádorech nalézáme ale pouze LOH 1p, v jiných naopak pouze LOH 19q (5–7).

U oligoastrocytomu v obou složkách nacházíme stejné aberace, což svědčí pro monoklonální původ nádoru. Schopnost diferenciaci do astrocytárního či oligodendrogliálního fenotypu je zřejmě ovlivněna podmínkami vnitřního prostředí.

Oligodendrogliomy se pouze vzácně objevují v dětství. Navíc v těchto nádorech nebyla doposud delece 1p či 19q prokázána (do 9 let věku). Ve vyšším věku již LOH 1p a 19q nalézáme, ale frekvence výskytu je mnohem nižší než u oligodendrogliomů v dospělosti. Častěji byla naopak zjištěna amplifikace těchto oblastí, navíc nebyl pozorován příznivý efekt chemoterapie jako u dospělých nemocných. Nabízí se dvě možnosti: 1. buď onkogeneze dětských oligodendrogliomů probíhá jinými cestami, 2. nebo se v některých případech může jednat o chybnou histologickou klasifikaci (např. dysembroblastický neuroepiteliální nádor – DNET, neurocytom, ependymom z jasných buněk) (8, 9).

Tumor-supresorový gen v oblasti 1p a 19q?

Přestože je u oligodendrogliomů nalézána delece 1p a 19q velmi často, zatím nebyl v této oblasti určen žád-

ný tumor-supresorový gen (TSG). Pro analýzu byly vybrány vzorky DNA z těchto nádorů, kde došlo k parciální deleci 1p či 19q. Jako oblast zájmu byl v případě delece 1p nakonec zvolen *TP73*, gen pro protein p73, který je do značné míry homologní s p53 (10) a nachází se v oblasti 1p36.32 (v oblasti *DIS468*). Přestože existoval velký předpoklad potvrzení role p73 v onkogenezi oligodendrogliomu, nebyly doposud v genu *TP73* nalezeny žádné mutace (11, 12), hypermethylace promotoru byla zjištěna v 46 % oligodendrogliomů a v 27 % anaplastických oligodendrogliomů (13). Navíc se ukazuje, že p73 se chová spíše jako onkogen než tumor-supresorový gen (v normální tkáni plic a ledvin byla zjištěna monoalelická exprese p73, zatímco v nádorech z těchto tkání exprese bialelická) (14, 15). *TP73* je imprintovaný a maternálně exprimovaný gen, ztráta imprintingu by mohla být součástí onkogeneze díky aktivaci němé alely a z toho vzniklé overexpresi genu. Situaci navíc komplikuje fakt, že existují dvě izofomy p73 se dvěma různými promotory, TAp73 a ΔNp73. TAp73 funguje jako TSG, zatímco ΔNp73 jako domnělý onkogen. Díky tomu, že ale nebyly žádné mutace *TP73* v oligodendrogliomech nalezeny, je jeho role jako TSG sporná. Zda se skutečně chová jako onkogen, není zatím dořešeno. Z dalších možných genů připadají v úvahu ještě *CDKN2C* a *RAD54* lokalizované na 1p32, nicméně v oligodendrogliomech jsou mutace *CDKN2C* vzácné (16) a mutace *RAD54* nebyla nalezena (17).

Delece 19q v oligodendrogliálních nádorech postihuje takřka vždy celé rameno chromozomu. Tato delece se vyskytuje i v astrocytomech, zde se ale často jedná o parciální deleci. Navíc u astrocytomů je tato delece známkou maligní progresy, což je v kontrastu s jejím výskytem u oligodendrogliomu, kde má význam přesně opačný. Díky výzkumu byla nakonec

oblast zájmu soustředěna na 19q13.3 mezi lokus *D19S412* a *STD* (18) a mezi *D19S241E* a *D19S596* (19). V této oblasti se nachází geny *GLTSCR1*, *EDH2*, *GLTSCR2* a *SW*, ale žádné abnormality těchto genů nebyly odhaleny (20).

Vzhledem k tomu, že dosud nebyl odhalen žádný tumor-supresorový gen, je možné že se může podílet na onkogenezi jiný mechanismus než doposud uvažovaný model dvojího zásahu“ (two-hit theory). Genomový imprinting se za normálních okolností podílí na embryonálním vývoji. Bylo ale prokázáno, že hraje roli i ve vzniku některých nádorů. Aberantní exprese takového imprintovaného genu může nastat delecí, mutací nebo methylací exprimované (neimprintované alely) nebo ztrátou imprintingu se zvýšením exprese příslušného imprintovaného protoonkogenu (21). Jak na 1p36, tak na 19q13 se nachází imprintované geny (např. *TP73* na 1p nebo *PEG3* (paternálně exprimovaný gen 3) (22). V některých nádorech byla skutečně zjištěna paternální delecce 19q, ale ne ve všech oligodendrogliomech a proto i tato hypotéza plně neobjasňuje onkogenezi oligodendroglálních nádorů (23).

V rámci možných příčin je nutné brát v potaz i metylaci jako epigenetický mechanismus genové regulace. Navíc některé geny, pokud jsou exprimovány pouze jednou funkční alelou, nedokáží dostatečně blokovat růst nádoru (24).

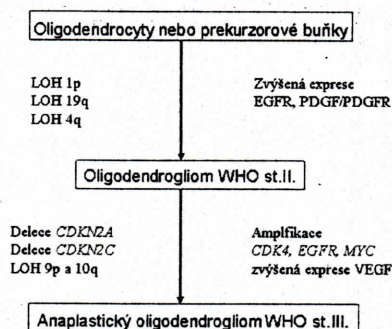
Ostatní genové abnormality v oligodendroglálních nádorech

Vedle již zmíněných změn můžeme v oligodendrogliomech a oligoastrocytomech nalézt v menší míře i mutace *TP53*, delecce *CDKN2A*, LOH 4q, 4p, 9p, 9q, 13q, 14q, 17p a 18q. Na rozdíl od astrocytomů je nález LOH 17p a mutace *TP53* sporadický a v kombinaci s LOH 1p vzácný (25). U anaplastických oligodendrogliomů se ale ve zvýšené míře vyskytují abnormality obdobné jako u astrocytomů. Nacházíme delecce 9p, delecce *CDKN2A/B* (9p21), delecce 10q, mutace *PTEN* (10q23), amplifikaci či overexpresi *EGFR* (7p12). Pomocí komparativní genomové hybridizace (CGH) pak byly detekovány i další delecce na 4q, 9p, 10, 13q, 15q a amplifikace na 7 a 8q. Všechny tyto aberace byly kromě amplifikace 8q (u 25 % oligodendrogliomů) nalezeny pouze u anaplastických oligodendrogliomů, takže existuje předpoklad, že tyto oblasti obsahují geny, které se podílí na maligní transformaci oligodendrogliomu v anaplastický oligodendrogliom (obr. 2). Individuální CGH studie pak směřují tuto maligní transformaci především na delecce 3p, 14q a 15q (26).

Alternativní genetické cesty u oligodendroglálních nádorů

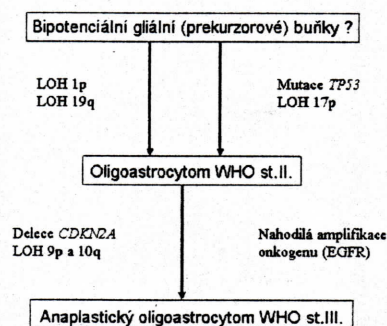
Vzhledem k tomu, že delecce 1p/19q nacházíme ve většině ale nikoli u všech oligodendroglálních nádorů, znamená to, že existují i jiné cesty onkogeneze těchto nádorů. V současné době u oligoastrocytomů přepokládáme, že existují nejméně dva způsoby, jak tyto tumory vznikají.

Genetické alterace u oligodendrogliomu a anaplastického oligodendrogliomu



Obr. 2. Genetické alterace spojené s progresí oligodendrogliomu (upraveno podle Kleihues P, Cavenee WK, editors. World Health Organisation classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000).

Genetické alterace u oligoastrocytomu a anaplastického oligoastrocytomu



Obr. 3. Genetické alterace spojené s progresí oligoastrocytomu (upraveno podle Kleihues P, Cavenee WK, editors. World Health Organisation classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: IARC Press, 2000).

kají. První je analogický k oligodendrogliomu, charakterizovaný přítomností LOH 1p/19q (cca 50 % oligoastrocytomů). Druhá cesta odpovídá cestě vzniku astrocytomů a je charakterizována mutací *TP53* nebo LOH 17p (cca 25 % oligoastrocytomů). Nádory, jejichž buňky nesou oba typy těchto alterací jsou málo časté (obr. 3) (3, 27).

CGH vyšetření vzorků 157 oligodendrogliomů prokázalo čtyři nejčastější typy detekovaných aberací (- 1p, - 19q, + 7, - 10) (5). Tato subtypizace je aplikovatelná na všechny oligodendrogliomy. Ve většině oligodendrogliomů byla nalezena delecce 1p a/nebo 19q (77/157). Někdy jsou nazývány „-1p/-19q“ oligodendrogliomy. V další části těchto nádorů byly nalezeny delecce na 10. chromozomu a naopak amplifikace na chromozomu 7, tzv. +7/-10 oligodendrogliomy (34/157). Malá část těchto nádorů byla označena jako „intermediate“ a byla charakterizována kombinací „-1p/-19q“ a „+7/-10“ (24/157). Existuje předpoklad, že se jedná primárně o „-1p/-19q“ oligodendrogliomy, u kterých v rámci maligní transformace dochází k delecce na 10. chromozomu a amplifikaci na 7. chromozomu (6). Zbytek těchto analyzovaných oligodendrogliomů neobsahoval ani jednu z předešlých čtyř aberací.

Porucha kontroly buněčného cyklu a maligní progresse

Cesty p53 a RB1 v bodě G₁/S jsou jedněmi z nejčastěji postižených regulačních mechanismů u mnoha neoplazií v rámci onkogeneze či maligní transformace. U nízkostupňových oligodendrogliomů, WHO stupeň II, jsou alterace cesty p53/RB1 vzácné (pouze 4 %/21 % analyzovaných nádorů), ale časté u anaplastických oligodendrogliomů, WHO stupeň III (65 %/50 %), přičemž současná porucha p53/RB1 byla u těchto vysokostupňových nádorů nalezena v 45 %. Podobně jako u astrocytomů v případě poruchy RB1 cesty to byly nejčastěji alterace *RB1* genu, dále *CDK4* a *CDKN2A*. U p53 cesty byly nejčastěji postiženy geny *TP53*, *p14ARF* a *MDM2*. Analýzou 9p21 u oligodendrogliomů bylo zjištěno, že mechanismem alterace příslušných genů (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *p14ARF*) je vedle ztráty oblasti 9p21 spíše hypermethylace než mutace. Hypermethylace těchto genů byla navíc ve významné korelaci s přítomností LOH 1p/19q a prakticky se nevyskytovala současně s mutací *TP53* (27). Při analýze genetických subtypů oligodendrogliomů bylo zjištěno, že nejčastěji je porucha p53 a RB1 cesty nalézána v „intermediate“ oligodendrogliomech (-1p/-19q a +7/-10) (7).

Molekulární analýza genové exprese pomocí mikročipů

Pokroky v mikročipové analýze umožňují paralelně vyšetřit mnoho genů jak na úrovni genomu (DNA), tak na úrovni exprese (RNA). Dvě studie se zabývaly přímo oligodendrogliomy. V první z nich porovnávaly oligodendrogliomy gr. II a anaplastické oligodendrogliomy gr. III byla prokázána rozdílná genová exprese v závislosti na grade tumoru. Druhá studie porovnávala +1p a -1p oligodendrogliomy. V +1p oligodendrogliomech bylo nalezeno 123 genů s nižší úrovní exprese a 86 genů s naopak vyšší úrovní exprese oproti -1p oligodendrogliomům. Ze 123 genů s minimálně o 50 % nižší úrovní exprese byla polovina na 1p a 10% na 19q (28).

Ependymomy

Ependymomy jsou nádory vycházející z ependymocytů, které tvoří výstelku komor a centrálního kanálku. Jedná se především o nádory dětského věku, v dospělosti se oproti ostatním gliálním tumorům vyskytují podstatně vzácněji, nejčastěji ve formě míšních tumorů. Z cytogenetických a molekulárně genetických prací vyplývá, že ependymomy jsou tvořeny nejméně dvěma skupinami odlišných nádorů. Jedna z nich je charakterizována výskytem především v dospělosti, typická je míšní lokalizace. V tkáni těchto nádorů je často nalezena monosomie chromozomu 22 a mutace *NF2* genu (29). Nádory v jiné lokalizaci nemají postižen *NF2* gen, ale může být přítomna jiná odchylka chromozomu 22 (30). U dětských nádorů nalézáme spíše poruchy chromozomu 6, dále monosomii chromozomu 13 či LOH 17p (31, 32). Alterace chromozomu 22 jsou u dětských ependymomů vzácné. Rovněž častým nálezem je amplifikace v oblasti

1q (1q22-31), kde předpokládáme nález některého z genů zodpovědných za progresi a/nebo senzitivitu k léčbě ependymomů. CGH analýzou byly nalezeny i ependymomy, jejichž CGH profil je normální, bez známek genové abnormality na úrovni chromozomu.

Gliomy mozku v rámci dědičných onemocnění

Cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření se uplatňuje i u hereditárních onemocnění charakterizovaných vznikem různých typů mozkových nádorů.

Neurofibromatóza I. typu (NF1) je charakterizována mimojiné tvorbou mnohočetných neurofibromů, především na kůži, ale mohou být postiženy i nervové struktury. Typickým postižením CNS při NF1 je gliom optiku (histologicky pilocytický astrocytom), který se při NF1 obvykle vyskytuje oboustranně, dále to jsou difúzní infiltrativně rostoucí astrocytomy a glioblastomy. Byla prokázána specifická genová porucha pro protein neurofibromin (GTPáza). *NF1* gen je lokalizován na 17q11.2. Nicméně z 300 dokumentovaných mutací genu pro neurofibromin bylo jen 21 z nich (7 %) zjištěno vícekrát. Nejčastěji se jedná o postižení exonu 7 (33).

Neurofibromatóza II. typu (MISME – Multiple Inherited Schwannomas, Meningiomas, Ependymomas) je podstatně vzácnější než NF1. Jedná se o autosomálně dominantně dědičné onemocnění. Je charakterizována vznikem oboustranného schwannomu akustiku, a dále mnohotným postižením nervových kořenů neurofibromy. Vedle toho jsou častým jevem i míšní ependymomy a meningeomy, méně často pak pilocytický astrocytom. *NF2* gen je lokalizován na chromozomu 22q12, protein je nazýván schwannomin (merlin) (34). Schwannomin je nádorový supresor, který je zavzat do aktin-cytoskeletárního aparátu. Alterace cytoskeleton je zřejmě prvním krokem v patogenezi některých nádorů.

Li-Fraumeni syndrom je onemocnění s autosomálně dominantním způsobem přenosu, je charakterizováno výskytem mnohotných nádorových onemocnění, především sarkomů, karcinomu prsu, hemoblastóz, ale rovněž mozkových tumorů, nejčastěji astrocytomů (13 %) (35). Ve většině případů Li-Fraumeni syndromu je etiologickým podkladem vrozená mutace genu *TP53*. V malém procentu byla nalezena mutace genu pro checkpointkinázu 2 (*CHEK2*-CHK2 checkpoint homolog (S. pombe), serine/threonine-protein kinase Chk2). Gen je lokalizován na 22q12.1. Tato kináza se aktivně účastní na buněčném cyklu a podílí se na zastavení cyklu v G2 fázi v buňkách s poškozenou DNA.

Komplex tuberózní sklerózy (TSC) je další z familiárních onemocnění, která postihují rovněž centrální nervovou soustavu. Až v 50 % najdeme pozitivní rodinnou anamnézu, zbytek jsou mutace *de novo*. Jedná se o autosomálně dominantně dědičné onemocnění s vysokou penetrancí, ale s fenotypovou variabilitou. Genetické studie prokázaly mutace v *TSC1* na 9q34 a častěji v *TSC2* na 16p13.3. Gen *TSC1* kóduje protein hamartin, který je exprimován především v mozku, ledvinách a srdci. Gen *TSC2* kóduje tuberin. Předpokládá se, že tuberin je nádoro-

rový supresor. Oba proteiny v buňce interagují, což vysvětluje prakticky nerozeznatelný klinický obraz obou forem. Mezi nejčastější projevy v CNS patří hamartomy (tubery), subkortikální glioneuronální hamartomy, subependymální gliální noduly a subependymální obrovskobuněčné astrocytomy (WHO grade I) (36, 37).

Turcotův syndrom je charakterizován výskytem kolo-
rektálního karcinomu a maligního neuroepiteliálního
nádoru (nejčastěji meduloblastomu či glioblastomu)
(38–40). Nejčastěji se objevuje v rámci familiární ade-
nomatózní polypózy (FAP) či syndromu hereditárního
nepolypózního kolorektálního karcinomu (HNPCC).
Vyskytuje se ve třech formách. U Turcotova syndromu
typ 1 se vyskytuje glioblastom, někteří pacienti mají
HNPCC, ale nemají FAP. Genetickým podkladem je vro-
zená mutace genů *hPMS2* (7p22), *hMSH2* (2p16) nebo
hMLH1 (3p21), které se uplatňují v mechanismu opravy
bodových mutací DNA (DNA mismatch repair) (41).
Přestože frekvence tumorů mozku v rámci HNPCC syn-
dromu je nízká, u některých pacientů vzniká glioblastom
(38–40), který rovněž nese znaky mikrosatelitové insta-
bility, nicméně postižené geny jsou odlišné od genů
postižených u kolorektálního karcinomu. Typ 2 je cha-
rakterizován výskytem meduloblastomu u pacientů
s FAP. Genetickým podkladem je v tomto případě muta-
ce genu *APC* (5q21) (42). Alterace *APC* může ovlivňovat
pohyblivost a adhezi epiteliálních kmenových buněk ve
střevě. Není jasné, zda se podobným způsobem uplatňuje
i v prekursorových buňkách mozku. Jako Typ 3 jsou
označovány izolované nefamiliární případy onemocnění.

NBCCS – Naevoid basal cell carcinoma syndrom je
autosomálně dominantně dědičné onemocnění spojené
se širokým spektrem vývojových anomálií a predispozi-
cí pro růst benigních a maligních nádorů. Syndrom je
způsoben vrozenou mutací genu *PTCH* na chromozomu
9q22.3 (43). V současné době je známo 67 mutací genu
PTCH v souvislosti s NBCCS, které jsou rozptýleny po
celé délce genu bez známky přítomnosti nějakých predi-
lekčních horkých míst („hot-spots“). Hlavním klinickým
projevem jsou mnohočetné kožní karcinomy, odontogen-
ní keratocysty a palmární a plantární dyskeratotické
dolíčky. V mozku se objevují kalcifikace, bývá makroce-
falie a vznikají některé nádory, dominantně medulobla-
stom.

Cowdenové choroba (CD) je autosomálně dominantně
dědičné onemocnění charakterizované různými hamar-
tomy a nádory. Hlavním intrakraniálním projevem cho-
roby je dysplastický gangliocytem mozečku. Další pro-
jevy jsou kožní léze a afekce sliznice dutiny ústní,
hamartomové polypy tlustého střeva, nádory štítné žlázy
a karcinom prsu. Dysplastický gangliocytem mozečku
(Lhermitte-Duclosova choroba) je benigní mozečková
léze postihující mladé jedince, složená z dysplastických
gangliových buněk. Nádor postihuje všechny věkové
skupiny s maximem kolem 34. roku života. Protože se
mozečkový nádor může objevit jako první a předcházet
další projevy CD, je nutné tyto pacienty dále sledovat,
především s ohledem na možnost vzniku karcinomu

prsu. Tato choroba je úzce spojena s jiným onemocněním
– Bannayan-Zonana syndromem, který je charakterizo-
ván mentální retardací a hamartomy. Obě onemocnění
jsou způsobena germinální mutací genu *PTEN* (44).

Prognóza a terapeutické implikace u mozkových gliomů na základě nalezených genových abnormalit

V současné době byla prokázána tato terapeutická
implikace spojená s dobrou prognózou pouze u oligo-
dendrogliomů. Pokud nádorová buňka nese delecí 1p
(pokud možno celého ramene) a ještě lépe v kombinaci
se ztrátou dlouhých ramen 19 (19q), jedná se o pozitivní
ukazatel chemosenzitivity a lepší prognózy těchto
nemocných. Všechny anaplastické oligodendrogliomy
s kombinovanou delecí 1p a 19q, nebo alespoň izolova-
nou na 1p velmi dobře reagují na chemoterapii kombina-
cí procarbazu, CCNU a vincristinu (PCV kombinace)
(45). Senzitivita k této léčbě je značná – polovina takto
léčebných pacientů vykazuje regresi tumoru na MR. Na
druhé straně jenom čtvrtina nádorů, u kterých uvedené
delece nejsou přítomné, reaguje na PCV léčbu, ale vždy
jenom částečně. Nedochází k regresi na MR. Tyto gene-
tické rozdíly též ovlivňují délku přežití. Pacienti s ana-
plastickým oligodendrogliomem s klasickou genetickou
kombinovanou delecí (-1p, -19q) mají průměrnou délku
přežití 10 let oproti 2 rokům u druhé podskupiny s dele-
cí na chromozomu 10 a amplifikací na chromozomu 7
(45). Pacienti s delecí *CDKN2A* mají naopak kratší prů-
měrnou délku přežití. U ostatních gliálních nádorů zatím
takový jednoznačný vztah nenacházíme, i když i zde se
objevují první zprávy, které do budoucna mohou změnit
naše současné postupy.

V březnu 2005 byla publikována multicentrická ran-
domizovaná studie léčby glioblastomů (46). Současně se
studii, která prokázala signifikantně vyšší účinnost léčby
konkomitantní chemoradioterapií s temozolomidem,
byla rovněž opublikována práce, která sledovala četnost
výskytu hypermethylace promotoru *MGMT* a která si
dala za cíl porovnat účinnost léčby temozolomidem
v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti hypermethy-
lace *MGMT* u stejné skupiny nemocných. Již předtím ale
několik studií prokázalo, že methylace *MGMT* promoto-
ru vede ke snížení exprese *MGMT* („gene silencing“) a
zároveň zvyšuje chemosenzitivitu k alkylačním cyto-
statikům (47).

O6-methylguanin-DNA methyltransferáza (*MGMT*)
je protein se schopností oprav DNA: odstraňuje alkyl
skupinu z pozice O6-guaninu, což je významná pozice
z hlediska DNA alkylace. Skupina vedená Dr. Hegi pro-
vedla specifickou PCR k určení methylace u celkem
307 z 573 vzorků tkáně glioblastomu. Ve 206 případech
byl výsledek dostatečně vypovídající, aby bylo možno
určit, zda je promotor *MGMT* methylován či nikoli.
V 92 případech byla methylace nalezena, ve 114 pro-
motor methylován nebyl. Pro celou skupinu 206 paci-
entů s identifikovaným promotorem *MGMT* platilo, že
byl signifikantní rozdíl, bez ohledu na léčbu, v celko-
vém přežití mezi skupinou s methylací a bez methylace

promotoru *MGMT*. Medián přežití u pacientů s methylací promotoru dosáhl 18,2 měsíce na rozdíl od skupiny bez methylovaného promotoru *MGMT*, kde medián přežití dosáhl pouze 12,2 měsíců. Pokud byl nález methylace vztažen i k léčebnému postupu (tj. konkomitantní chemoradioterapie temozolomidem s následnou adjuvantní léčbou temozolomidem versus samotná radioterapie), pak nejdelšího mediánu přežití – 21,7 měsíců dosáhla skupina nemocných s methylací promotoru *MGMT*, kteří byli zároveň randomizováni do skupiny konkomitantní chemoradioterapie. Dvouletého přežití v této skupině dosáhlo 46 % pacientů, oproti 22,7 % těch s methylací *MGMT* promotoru, kteří byli randomizováni do větve radioterapie bez temozolomidu (48). Tyto údaje naznačují, že stav methylace *MGMT* promotoru může mít určitý prognostický význam, zároveň může být určujícím parametrem účinnosti temozolomidu v léčbě maligních gliomů, nepřítomnost methylace *MGMT* promotoru značí pouze malý nebo dokonce žádný prospěch z léčby temozolomidem, pokud bychom se nepokusili *MGMT* depletovat např. O6-benzylguaninem.

Literatura

- Kraus JA, Koopmann J, Kaskel P, Maintz D, Brandner S, Schramm J, et al. Shared allelic losses on chromosomes 1p and 19q suggest a common origin of oligodendroglioma and oligoastrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 91–5.
- Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol* 1994; 145: 1175–90.
- Maintz D, Fiedler K, Koopmann J, Rollbrocker B, Nechev S, Lenartz D, et al. Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 1098–104.
- Ransom DT, Ritland SR, Moertel CA, Dahl RJ, O'Fallon JR, Scheithauer BW, et al. Correlation of cytogenetic analysis and loss of heterozygosity studies in human diffuse astrocytomas and mixed oligo-astrocytomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1992; 5: 357–74.
- Jeuken JW, Sprenger SH, Wesseling P, Macville MV, von Deimling A, Teepen HL, et al. Identification of subgroups of high-grade oligodendroglial tumors by comparative genomic hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58: 606–12.
- Jeuken JW, Sprenger SH, Vermeer H, Kappelle AC, Boerman RH, Wesseling P. Chromosomal imbalances in primary oligodendroglial tumors and their recurrences: clues about malignant progression detected using comparative genomic hybridization. *J Neurosurg* 2002; 96: 559–64.
- Jeuken JW, Boots-Sprenger SH, Wesseling P. Chromosomal imbalances in oligodendroglial tumors as detected by comparative genomic hybridization (CGH). In: Zhang W, Fuller GN (eds) *Genomic and Molecular Neuro-Oncology*. Sudbury MA: Jones and Bartlett Publishers; 2004. p. 185–98.
- Raghavan R, Balani J, Perry A, Margraf L, Vono MB, Cai DX, et al. Pediatric oligodendrogliomas: a study of molecular alterations on 1p and 19q using fluorescence in situ hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 530–7.
- Perry A, Scheithauer BW, Macaulay RJ, Raffel C, Roth KA, Kros JM. Oligodendrogliomas with neurocytic differentiation. A report of 4 cases with diagnostic and histogenetic implications. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 947–55.
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997; 90: 809–19.
- Alonso ME, Bello MJ, Lomas J, Gonzalez-Gomez P, Arjona D, De Campos JM, et al. Absence of mutation of the p73 gene in astrocytic neoplasms. *Int J Oncol* 2001; 19: 609–12.
- Mai M, Huang H, Reed C, Qian C, Smith JS, Alderete B, et al. Genomic organization and mutation analysis of p73 in oligodendrogliomas with chromosome 1 p-arm deletions. *Genomics* 1998; 51: 359–63.
- Dong S, Pang JC, Hu J, Zhou LF, Ng HK. Transcriptional inactivation of TP73 expression in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 2002; 98: 370–5.
- Mai M, Qian C, Yokomizo A, Tindall DJ, Bostwick D, Polychronakos C, et al. Loss of imprinting and allele switching of p73 in renal cell carcinoma. *Oncogene* 1998; 17: 1739–41.
- Mai M, Yokomizo A, Qian C, Yang P, Tindall DJ, Smith DL, et al. Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 2347–9.
- Pohl U, Cairncross JG, Louis DN. Homozygous deletions of the CDKN2C/p18INK4C gene on the short arm of chromosome 1 in anaplastic oligodendrogliomas. *Brain Pathol* 1999; 9: 639–43.
- Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Ruiz-Barnes P, Kusak ME, Sarasa JL, et al. hRAD54 gene and 1p high-resolution deletion-mapping analyses in oligodendrogliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 116: 142–7.
- Rosenberg JE, Lisle DK, Burwick JA, Ueki K, von Deimling A, Mohrenweiser HW, et al. Refined deletion mapping of the chromosome 19q glioma tumor suppressor gene to the D19S412-STD interval. *Oncogene* 1996; 13: 2483–5.
- Smith JS, Tachibana I, Lee HK, Qian J, Pohl U, Mohrenweiser HW, et al. Mapping of the chromosome 19 q-arm glioma tumor suppressor gene using fluorescence in situ hybridization and novel microsatellite markers. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29: 16–25.
- Smith JS, Tachibana I, Pohl U, Lee HK, Thanarajasingam U, Portier BP, et al. A transcript map of the chromosome 19q-arm glioma tumor suppressor region. *Genomics* 2000; 64: 44–50.
- Jirtle RL. Genomic imprinting and cancer. *Exp Cell Res* 1999; 248: 18–24.
- Kohda T, Asai A, Kuroiwa Y, Kobayashi S, Aisaka K, Nagashima G, et al. Tumour suppressor activity of human imprinted gene PEG3 in a glioma cell line. *Genes Cells* 2001; 6: 237–47.
- Hartmann C, Mueller W, Lass U, Stockhammer F, von Eckardstein K, Veelken J, et al. No preferential loss of paternal 19q alleles in oligodendroglial tumors. *Ann Neurol* 2003; 54: 256–8.
- Largaespada DA. Haploinsufficiency for tumor suppression: the hazards of being single and living a long time. *J Exp Med* 2001; 193: F15–8.
- Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, Hirose T, Hirato J, Funada N, et al. Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 196–201.
- Weber RG, Sabel M, Reifenberger J, Sommer C, Oberstrass J, Reifenberger G, et al. Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. *Oncogene* 1996; 13: 983–94.
- Wolter M, Reifenberger J, Blaschke B, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP, et al. Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of the CDKN2A (MTS1, p16INK4a), p14ARF, and CDKN2B (MTS2, p15INK4b) tumor suppressor genes. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 1170–80.
- Mukasa A, Ueki K, Matsumoto S, Tsutsumi S, Nishikawa R, Fujimaki T, et al. Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p. *Oncogene* 2002; 21: 3961–8.
- Ebert C, von Haken M, Meyer-Puttitz B, Wiestler OD, Reifenberger G, Pietsch T, et al. Molecular genetic analysis of ependymal tumors. NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal ependymomas. *Am J Pathol* 1999; 155: 627–32.
- Kraus JA, de Millas W, Sorensen N, Herbold C, Schichor C, Tonn JC, et al. Indications for a tumor suppressor gene at 22q11 involved in the pathogenesis of ependymal tumors and distinct from hSNF5/INI1. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001; 102: 69–74.
- Kramer DL, Parmiter AH, Rorke LB, Sutton LN, Biegel JA. Molecular cytogenetic studies of pediatric ependymomas. *J Neurooncol* 1998; 37: 25–33.
- Dyer S, Prebble E, Davison V, Davies P, Ramani P, Ellison D,

- et al. Genomic imbalances in pediatric intracranial ependymomas define clinically relevant groups. *Am J Pathol* 2002; 161: 2133–41.
33. Ars E, Kruyer H, Morell M, Pros E, Serra E, Ravella A, et al. Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients. *J Med Genet* 2003; 40: e82.
 34. Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, et al. Alteration in a new gene encoding putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 1993; 363: 515–21.
 35. Kyritsis AP, Bondy ML, Xiao M, Berman EL, Cunningham JE, Lee PS, et al. Germline p53 gene mutations in subset of glioma patients. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 344–9.
 36. Al-Saleem T, Wessner LL, Scheithauer BW, Patterson K, Roach ES, Dreyer SJ, et al. Malignant tumors of the kidney, brain, and soft tissues in children and young adults with the tuberous sclerosis complex. *Cancer* 1998; 83: 2208–16.
 37. Ali JBM, Sepp T, Ward S, Green AJ, Yates JRW. Mutations in the TSC1 gene account for a minority of patients with sclerosis. *J Med Genet* 1998; 35: 969–72.
 38. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332: 839–47.
 39. Chan TL, Yuen ST, Chung LP, Ho JW, Kwan K, Fan YW, et al. Germline hMSH2 and differential somatic mutations in patients with Turcot's syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 25: 75–81.
 40. Kanamori M, Kon H, Nobukuni T, Nomura S, Sugano K, Mashiyama S, et al. Microsatellite instability and the PTEN1 gene mutation in a subset of early onset gliomas carrying germline mutation or promoter methylation of the hMLH1 gene. *Oncogene* 2000; 19: 1564–71.
 41. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1248–55.
 42. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332: 839–47.
 43. Schofield D, West DC, Anthony DC, Marshal R, Sklar J. Correlation of loss of heterozygosity at chromosome 9q with histological subtype in medulloblastomas. *Am J Pathol* 1995; 146: 472–80.
 44. Marsh DJ, Dahia PL, Zheng Z, Liaw D, Parsons R, Gorlin RJ, et al. Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat Genet* 1997; 16: 333–4.
 45. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1473–9.
 46. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10): 987–96.
 47. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343: 1350–4. Erratum in: *N Engl J Med* 2000; 343: 1740.
 48. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10): 997–1003.

Správné odpovědi na vědomostní test k Minimonoграфии ČSNN 6/06: Amyotrofická laterální skleróza, onemocnění motoneuronu

1A, 2B, 3B, 4A, 5E, 6AD, 7C, 8B, 9A,C,E, 10 C,D, 11 A,B,C, 12 A,B,C, 13 A,C, 14 B, 15 D.

Douglas L. Brockmeyer. Advanced Pediatric Craniocervical Surgery. Thieme Stuttgart, New York, 2000, Rüdigerstrasse 14, D 70469, Stuttgart, Germany, 333 Seventh Avenue, New York, NY 1001, USA. GTV ISBN 3 13 132081 8. TMP ISBN 1-58890-396-6.

Kniha je rozdělena do 7 kapitol, má 132 stránek, a mnoho kvalitních schémat a fotografií. Je určena zejména specialistům, dětským neurochirurgům, ale i ortopedům či traumatologům zabývajícím se problematikou kraniocervikálního spojení. Kapitola první se zabývá anatomii, embryologií, normálním a abnormálním vývojem kraniocervikálního spojení. V kapitole druhé najde čtenář klinickou biomechaniku. V kapitole třetí jsou probírány patologické jednotky jako Downův či Klippel-Feilův syndrom, neurofibromatóza I. typu a další. Traumatologie je podrobně probírána v kapitole 4, a to včetně poranění měkkých tkání a vazivového aparátu. V kapitolách 5–7 jsou popsány techniky konzervativní a chirurgické léčby kraniocervikálního spojení u dětí. Jednotlivé kapitoly jsou velmi kvalitně doplněny obrazovou

dokumentací. Ve své podstatě je publikace koncipována jako atlas s jasným až schématickým doporučením k léčbě celého spektra onemocnění postihujícím kraniocervikální spojení. Závěry kapitol jsou přehledné, je zde kladen důraz na rozdíly mezi dětskou a dospělou páteří. Jsou zde shrnuty léčebné postupy, které byly vysvětleny v samotné kapitole. Slouží jako rychlý, přehledný návod k léčbě. Kniha je dílem kolektivu autorů, zabývajících se intenzivně danou problematikou. Poskytuje čtenáři zkušenosti vynikajících odborníků. Nikoliv dogmatiky, ale se snahou o diskusi. Dává možnost zamyslet se nad řešením jednotlivých typů onemocnění.

Prof. Pavel Haninec

Molecular Cytogenetic Stratification of Recurrent Oligodendrogliomas: Utility of Interphase Fluorescence in Situ Hybridization (I-FISH)

(brain tumours / oligodendroglioma / I-FISH / deletion of 1p36 and 19q13.3)

Z. ZEMANOVÁ¹, F. KRAMAR², L. BABICKÁ¹, Š. RANSORFOVÁ³, J.,
MELICHERČÍKOVÁ³, P. HRABAL⁴, P. KOZLER², K. MICHALOVÁ^{1,3}

¹Centre of Oncocytogenetics, Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics,
1st Faculty of Medicine, Charles University, and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic

²Neurosurgical Department, Central Military Hospital, Prague, Czech Republic

³Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

⁴Department of Pathology and Anatomy, Central Military Hospital, Prague, Czech Republic

Abstract. In oligodendroglial brain tumours, losses of chromosomal material of the short arm of chromosome 1 and long arm of chromosome 19 have been shown to predict responsiveness to chemotherapy and prolonged patients' survival. Therefore, the correct diagnosis of these genetic alterations in tumours of oligodendroglial origin is particularly important. To detect deletions of 1p36 and/or 19q13.3 in oligodendroglial cells we used dual-colour I-FISH with locus-specific DNA probes. I-FISH was performed on isolated whole cell nuclei, prepared from fresh non-fixed tumour tissue samples resuspended in media and processed using a standard cytogenetic procedure, thus bypassing the problem of nuclear truncation. We examined 16 patients with histologically proved oligodendrogliomas (5x oligodendroglioma, 9x anaplastic oligodendroglioma, 2x anaplastic oligoastrocytoma). The results of molecular cytogenetic analyses were correlated with morphological and clinical findings. Molecular cytogenetic analyses were successful in 15 patients and, due to a non-adequate tissue specimen, were uninformative in one patient only. Combined deletions 1p36/19q13 were proved in 13 patients. However, in six of them additional genetic alterations typical for high-grade astrocytoma were found, which could have negative influence on the prognosis. One patient had isolated deletion of 1p36 and another had a normal genetic pattern without any chromosomal alterations. In summary,

I-FISH on isolated cell nuclei is a powerful tool for detecting chromosomal aberrations in tumour cells. A systematic molecular cytogenetic analysis may advance diagnosis, prognostic stratification, and targeted treatment of patients with brain tumours.

Introduction

Diffuse gliomas are the most common primary tumours of the central nervous system affecting adults. It is a heterogeneous group of tumours with various histological subtypes that differ in response to treatment and in the prognosis of the disease (Smith et al., 2000). The most frequent tumours are derived from astrocytes and from oligodendrocytes. Traditionally, the classification and grading system of glial tumours is based on histopathological features, such as resemblance of astrocytic or oligodendrocytic cells, nuclear pleomorphism, mitotic activity, proliferation rate, necrosis, etc. The World Health Organization classification of gliomas recognizes three major histological types of tumours: astrocytomas, oligodendrogliomas, and oligoastrocytomas. Each type can be further divided into two or three malignancy grades (Cowell et al., 2004). Oligodendrogliomas are graded using a two-tiered system where well-differentiated tumours are considered to be Grade II and anaplastic variants are Grade III (Kelley et al., 2005).

The treatment of diffuse gliomas (surgery, radiotherapy and chemotherapy) is problematic due to their diffuse nature. Surgical intervention never succeeds in removing the tumour tissue completely. This is why the disease relapses and progresses even in case of lower-grade tumours (Godard et al., 2003). Differentiation of glial subtypes based solely on nuclear and cellular morphology is subjective and various subtypes sometimes cannot be distinguished even when using specific immunohistochemical markers. However, the correct diagnosis of tumours of oligodendroglial origin (including oligoastro-

Received May 22, 2006. Accepted June 28, 2006

Supported by grants IGA MZ CR 1A/8237-3, MSM LC535 and MZO 00064165.

Corresponding author: Zuzana Zemanová, Centre of Oncocytogenetics, Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, 1st Faculty of Medicine, Charles University, and General Teaching Hospital, Prague, U Nemocnice 1, 128 08 Prague 2, Czech Republic, e-mail: zuze@vfn.cz

Abbreviations: CEP – chromosome enumeration probe, CGH – comparative genomic hybridization, EGFR – epidermal growth factor receptor, I-FISH – interphase fluorescence *in situ* hybridization, LSI – locus-specific.

Folia Biologica (Praha) 52, 71-78 (2006)

cytomas) is particularly important because 60% to 70% of anaplastic oligodendrogliomas (AO) are sensitive to combined chemotherapy and their prognosis is significantly better than that for astrocytic tumours of corresponding grades (Coweli et al., 2004). Therefore, new diagnostic and prognostic indicators must be sought to enable stratification of the treatment and to help reduce morbidity and mortality of patients. Subclassification of patients according to specific chromosomal aberrations in tumour cells is one of the possibilities.

Cytogenetic and molecular studies of glial tumours performed during the last decade identified several recurrent, non-random genetic abnormalities associated with different subtypes of glial tumours. Specific gene mutations, loss of heterozygosity, deletions and/or amplifications of entire chromosomal regions were described in specific tumours including gliomas. Gliomas are characterized particularly by chromosomal deletions, inappropriately activated intracellular signalling pathways, and/or loss of the activity of tumour suppressor proteins. The most frequent specific alteration in oligodendroglial tumours, grades II and III, is the combined loss of chromosomal arms 1p and 19q, which could be found in 50–80% of patients. In astrocytic tumours of higher grades, other chromosomal aberrations associated with tumour progression could be found. The most frequent and most important alterations thought to influence the prognosis include 9p21 (*p16*, *CDKN2A*), 13q14 (*RBI*), 10q23 (*PTEN*) deletions and/or monosomy of the whole chromosome 10 as well as epidermal growth factor receptor (*EGFR*) amplification (Table 1).

Over the last few years, certain molecular cytogenetic and molecular genetic techniques have been developed and applied to the workup of gliomas. This has resulted in improved diagnostic and prognostic accuracy and has allowed the clinician to formulate a potentially more effective treatment strategy. In this study we used interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH) and/or comparative genomic hybridization (CGH) for detection of specific genetic alterations in

oligodendroglial cells. I-FISH was performed on whole cell nuclei prepared from tumour cell suspensions by a standard cytogenetic procedure. This approach overcomes the problem of nuclear truncation, which is characteristic for analysis of sections prepared from frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.

Our work was aimed at detailed molecular cytogenetic study in a group of patients with histologically proved oligodendrogliomas and/or oligoastrocytomas with focus on detection of the most frequent and prognostically most important chromosomal aberrations described in oligodendroglial tumours so far, i.e. deletions of chromosomal regions 1p36 and 19q13.3, and on comparison of the results of the molecular cytogenetic analysis in all patients with morphological and clinical findings.

Material and Methods

Patients

The study included 16 patients with histologically confirmed oligodendrogliomas and/or oligoastrocytomas (WHO grade II-III) admitted to the Department of Neurosurgery of the 1st Faculty of Medicine and Central Military Hospital in Prague between March 2004 and December 2005. All examinations were carried out on cells acquired from tumour tissue taken during a routinely performed neurosurgical procedure. All patients gave written informed consent to the proposed therapeutic procedure and to the provision of samples for research purposes.

Sample extraction and processing

Fresh non-fixed tumour tissue samples were resuspended in media (PBS, heparin) and further processed using standard cytogenetic procedure (hypotonia, fixation). Standard microscopic preparations for I-FISH were prepared from fixed cell suspensions. When a sufficient amount of a sample was available, part of the tumour tissue was used for isolation of DNA, which was further processed by CGH.

Table 1. Specific chromosomal aberrations in different subtypes of diffuse gliomas

type of diffuse glioma	subtype	WHO grade	chromosomal aberrations
astrocytoma	diffuse astrocytoma	II	deletion/mutation of <i>p53</i> gene, aneuploidy
	anaplastic astrocytoma	III	deletion of <i>p53</i> gene, deletion of <i>p16</i> gene, deletion of <i>RBI</i> gene, aneuploidy
	glioblastoma multiforme – primary	IV	amplification of <i>EGFR</i> gene , deletion of <i>p16</i> gene, deletion of <i>RBI</i> gene, monosomy 10 , aneuploidy
	glioblastoma multiforme – secondary	IV	deletion of <i>p53</i> gene, deletion of <i>p16</i> gene, deletion of <i>RBI</i> gene, monosomy 10 , aneuploidy
oligodendroglioma	low-grade oligodendroglioma	II	deletion of 19q13.3, deletion of 1p36, aneuploidy
	anaplastic oligodendroglioma	III	deletion of 19q13.3 / deletion of 1p36 , aneuploidy (combined deletions are markers of good prognosis)

Molecular cytogenetic analyses

I-FISH: Dual-colour interphase FISH with locus-specific (LSI) and/or chromosome enumeration (CEP) DNA probes (Abbott Vysis™, Des Plaines, IL) was carried out according to manufacturers' recommendations for detection of the most frequent chromosomal changes in glial cells. All samples were analysed by the LSI 1p36/1q25 and LSI 19q13/19p13 dual-colour probe set for detection of the 1p36 deletion (spectrum green-labelled 1q25 control probe and spectrum orange-labelled 1p36 test probe) and the 19q13 deletion (spectrum green-labelled 19p13 control probe and spectrum orange-labelled 19q13 test probe). In some cases probes for detection of deletion of *RB1* and/or *p16* genes, amplification of the *EGFR* gene and/or monosomy of chromosome 10 were also used (used probes are listed in Table 2). Cells were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Slides were viewed using a fluorescent motorized Axioplan II microscope (Zeiss, Göttingen, Germany) with appropriate optical filters by two independent observers. In each case, hybridization signals of at least 200 tumour cell interphase nuclei were assessed. The ratio between the numbers of fluorescence signals of tested and control regions on chromosomes 1 and 19 was calculated. The image was captured by a sensitive CCD camera and the result was processed by specialized *ISIS* software (MetaSystems GmbH, Altlussheim, Germany) for documentation.

The cut-off value (i.e. the breakpoint for classification of the findings as positive or negative) was determined using control group samples obtained by brain tissue resection in patients who underwent epileptology surgery. In these samples, I-FISH analyses were performed using the same procedure and appropriate DNA probes. The average value and the standard deviation for the entire control group were determined. The breakpoint was defined as the average value +2 SD, which ensured the level of the diagnostic test specificity of 97.5% for amplifications and/or 95.0% for deletions, assuming normal error distribution.

CGH: CGH analysis was performed on the same material used for cytogenetic analysis according to the previously published procedure (Kallioniemi et al., 1992). Briefly, DNA was extracted using liquid nitrogen and a DNA isolation kit for mammalian blood (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Tumour DNA was labelled with a Spectrum Green dUTP by CGH Nick Translation Kit (Abbott Vysis™). Approximately 200–400 ng Spectrum Green tumour DNA and 200 ng Spectrum Red normal reference DNA (Abbott-Vysis) were ethanol-precipitated together with 10 µg Cot-1 DNA, centrifuged, resuspended in CGH hybridization buffer, denatured, and hybridized to normal metaphase slides for 3 days. After hybridization, the slides were washed for 2 min in 0.4x SSC/0.3% NP40 at 74°C, and 30 s in 2x SSC/0.1% NP40 at ambient temperature. CGH analysis was performed using *ISIS* software (MetaSystems™). For each analysis, at least 15 metaphases were captured. Interpretation of CGH profiles was done according to the published criteria (Isola et al., 1994).

Results

Clinical data

We examined 16 patients with histologically proved oligodendroglial tumours (5x oligodendroglioma, WHO grade II; 9x anaplastic oligodendroglioma, WHO grade III; 2x anaplastic oligoastrocytoma, WHO grade III). There were six men and 10 women with mean age 43.5 years (ranging from 24 to 69 years). Clinical and treatment data of the patients are given in Table 3. Fourteen patients are alive, two women died – one of tumour progression and the other of non-oncological disease. Mean overall survival was 37.6 months (ranging from 4 to 135 months). Recurrence or tumour progression occurred in 10 cases (1–3 times). Mean time of progression-free survival (PFS) in our patient cohort was 24.2 months (median 12.5 months; ranging from 4 to 111 months). Six patients are alive at present, without any symptoms of progression and/or recurrence of the disease.

Table 2. DNA probes for I-FISH (Abbott Vysis)

Chromosome aberration	DNA probe mix	labelling
deletion of <i>p16</i> (<i>CDKN2A</i>)	LSI® <i>p16</i> (9p21) / CEP® 9	
deletion of <i>RB1</i>	LSI® <i>RB1</i> (13q14) / LSI® 13qter	
deletion of 1p36	LSI® 1p36 / LSI® 1q25	SO /SG
deletion of 19q13.3	LSI® 19q13/ LSI® 19p13	
amplification of <i>EGFR</i>	LSI® <i>EGFR</i> / CEP® 7	
monosomy 10	CEP® 10 / control CEP® probe	

CEP – chromosome enumeration probe (centromeric, α satellite); LSI – locus-specific; SO – Spectrum Orange; SG – Spectrum Green

Table 3. Clinical data of patients

Pat. No.	Age at dg (years)	Sex	dg	WHO grade	Locali- zation	KFS	Resection	Ki-67 index (%)	Necrosis	Chemotherapy	Radio- therapy	Reccurrence or progressi- on	PFS (mo)	OS (mo)
1	36	M	AO	III	F	100	total	3.0	no	PCV	no	yes	25	78+
2	54	F	AO	III	F	0	partial	nd	yes	temozolomide	no	yes	12	16
3	38	M	AO	III	F	100	total	20.0	no	PCV	no	yes	6	25+
4	38	F	AO	III	CC	100	biopsy	nd	yes	PCV	no	no	18+	18+
5	59	M	AO	III	PT	100	partial	nd	no	temozolomide	no	no	13+	13+
6	52	F	AO	III	PT	100	partial	nd	no	PCV	no	yes	10	21+
7	24	M	AO	III	F	100	total	5.0	no	PCV	yes	yes	30	58+
8	69	F	AO	III	F	90	total	nd	yes	PCV	no	no	5+	5+
9	62	F	AO	III	F	90	partial	nd	no	PCV	no	no	4+	4+
10	30	M	AO	III	F	100	partial	nd	yes	PCV	yes	yes	111	135+
11	24	F	AOA	III	F	100	total	nd	no	PCV	no	yes	54	63+
12	39	F	AOA	III	F	100	partial	10.0	yes	temozolomide	yes	no	9+	9+
13	56	F	O	II	F	0	partial	0.5	no	WS	no	yes	11	20
14	31	F	O	II	F	100	total	5.0	no	WS	no	yes	47	79+
15	54	F	O	II	F	100	biopsy	15.0	no	WS	no	yes	28	53+
16	30	M	O	II	F	100	total	0.5	no	WS	no	no	4+	4+

Diagnosis: O – oligodendroglioma, AO – anaplastic oligodendroglioma; AOA – anaplastic oligoastrocytoma

Localization: F – frontal lobe; CC – corpus callosum; PT – parietotemporal

Chemotherapy: PCV – procarbazine/lomustine/vincristine; WS – watch and scan

PFS – progression-free survival in months

OS – overall survival in months

nd – not done

Table 4. Molecular cytogenetic findings

Pat. No.	Deletion 1p36	Deletion 19q13.3	Polysomy 7 / <i>EGFR</i> amplification	Monosomy 9 / deletion <i>CDKN2A</i>	Deletion <i>RB1</i>	Monosomy 10	CGH
1	yes	yes	no	yes	no	no	nd
2	yes	yes	no	yes	no	yes	nd
3	yes	yes	yes	yes	no	no	nd
4	no	no	nd	nd	nd	nd	nd
5	no	no	nd	nd	nd	nd	nd
6	yes	yes	nd	nd	nd	nd	nd
7	yes	yes	yes	yes	yes	yes	nd
8	yes	yes	nd	nd	nd	nd	del(1p),del(5q),+7,-9,+11
9	yes	yes	yes	nd	nd	no	del(1p),-18,del(19q),del(22q)
10	yes	yes	nd	nd	nd	nd	nd
11	yes	yes	nd	nd	nd	nd	nd
12	yes	no	nd	nd	nd	nd	nd
13	yes	yes	yes	no	no	no	nd
14	yes	yes	no	nd	nd	no	del(1p),del(16q),del(19q),del(22q)
15	yes	yes	no	nd	nd	no	nd
16	yes	yes	no	nd	nd	no	nd

nd – not done

Data of I-FISH analysis

Molecular cytogenetic findings are given in Table 4. I-FISH results in most cases corresponded well with histological and clinical findings and confirmed original diagnosis. Molecular cytogenetic analyses were successful in 15 patients (94%) and were uninformative

in one patient only due to a non-adequate tissue specimen (No. 4).

Combined deletions of 1p36 and 19q13.3 regions were proved in 13 patients (Figure 1a, 1b). Besides 1p36/19q13 deletions, additional genetic alterations typical for high-grade glioma were detected in six of

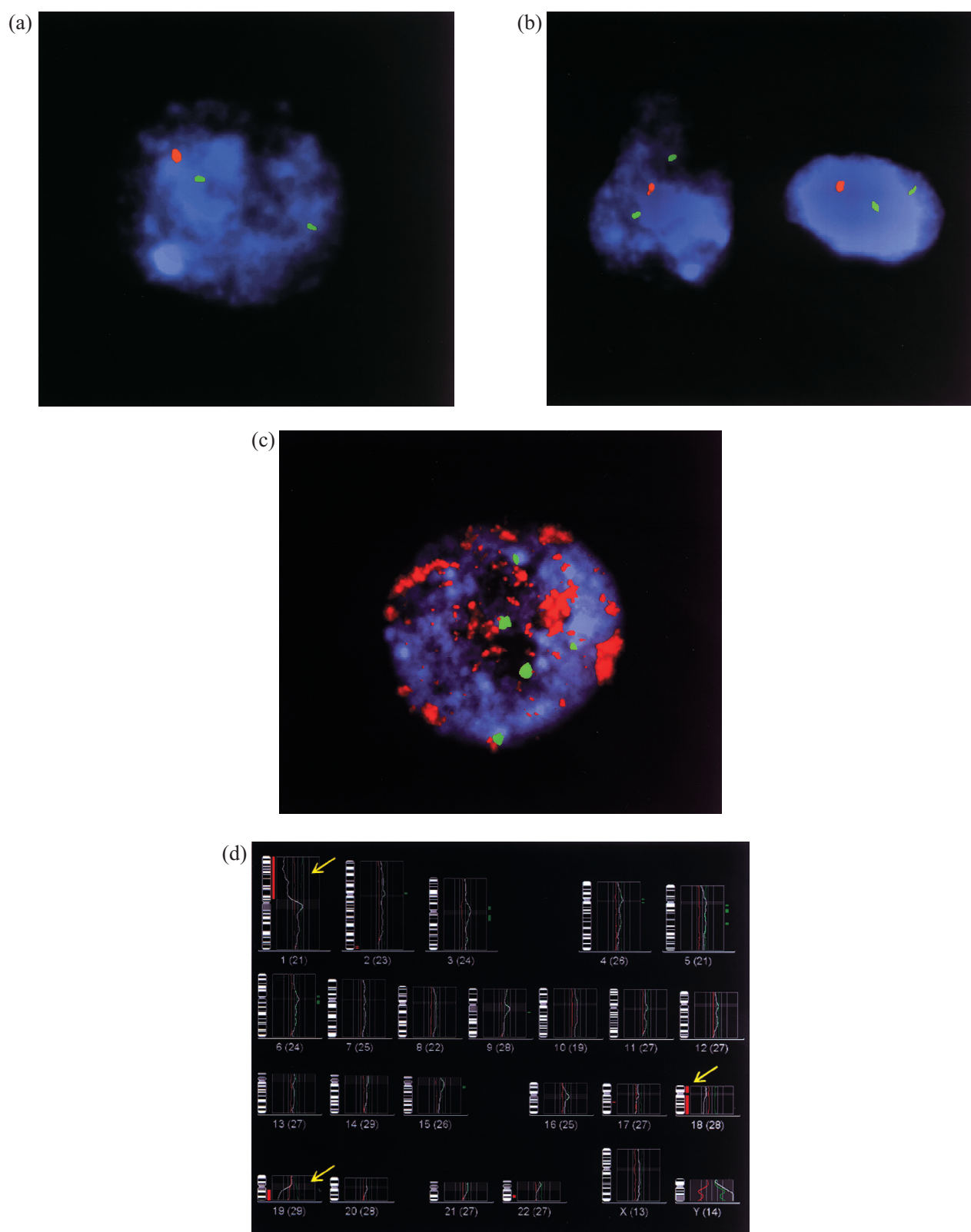


Fig. 1. (a) Non-dividing nuclei of brain tumour cells of patient No. 1 after hybridization with LSI 1p36 (red signal) / LSI 1q25 (green signal) Dual Color Probe Set (Abbott-Vysis™) showing deletion of the 1p36 region. (b) Abnormal cells of the same patient (No. 1) hybridized with LSI 19p13 (green signal) / LSI 19q13 (red signal) Dual Color Probe Set (Abbott-Vysis™). Deletion of the 19q13 region was proved. (c) LSI EGFR (red signal) / CEP 7 (green signal) Dual Color Probe (Abbott-Vysis™) hybridized to a nucleus indicating five copies of chromosome 7 and high amplification of the *EGFR* gene (patient No. 13). (d) CGH profile of patient No. 9, which shows loss of 1p, 19q and monosomy of the whole chromosome 18 [ish cgh dim(1)(p13pter),dim(18),dim(19)(q13qter)].

the patients. These findings could have a negative influence on the prognosis of the disease (*EGFR* amplification or polysomy of chromosome 7 in four cases (Figure 1c), monosomy 10 in two cases, monosomy 9 or deletion of *CDKN2A* in four cases, and deletion of the *RBI* gene in one case). Recurrence or tumour progression appeared in five of these cases. In one patient (No. 11), isolated deletion of 1p36 was detected. One tumour sample (No. 5) was classified as normal without any chromosomal alteration.

Data of CGH analysis

CGH analysis was done in three patients with oligodendroglioma. Combined deletion 1p/19q was confirmed in concordance with FISH analyses in patient No. 9 (Figure 1d) and patient No. 14. Patient No. 8 was positive for combined deletion of 1p36 and 19q13 according to FISH, contrary to CGH analysis, which did not prove deletion of the 19q region due to the resolution of this method. In addition, CGH revealed deletion of the terminal region of chromosome 5q, trisomy of chromosomes 7, 11, and monosomy of chromosome 9 in patient No. 8.

Discussion

Oligodendrogliomas are glial tumours in which the oligodendroglial cell is the predominant cell type. In contrast to other types of gliomas, oligodendroglioma is associated with generally good response to adjuvant therapy (Paleologos and Cairncross, 1999). Therefore, in patients with oligodendrogliomas chemotherapy is recommended as the primary treatment modality. The diagnosis of oligodendrogliomas, however, is frequently complicated by the fact that many tumours contain an astrocytic component. Furthermore, the pathology of these tumours is very complex and differentiation of glial subtypes based solely on morphology is subjective, and various subtypes cannot be distinguished even when using specific immunohistochemical markers. It is essential to distinguish oligodendrogliomas from astrocytomas because of the different therapeutic approaches to these tumours. Due to the limitation of histological classification and grading system, new prognostic factors must be found. Genetic alterations in gliomas seem to be one of these new independent prognostic markers (Belaud-Rotureau et al., 2006).

Cytogenetic and molecular studies have identified genetic aberrations during the tumorigenesis and progression of gliomas. The most characteristic are chromosomal deletions, inappropriately activated intracellular signalling pathways, and/or loss of the activity of tumour suppressor proteins. In high-grade gliomas, several specific deletions could be found: deletion of the 9p21 region (*p16*, *CDKN2A*), deletion of the 13q14 region (*RBI*), deletion of the 10q23 region (*PTEN*) and/or monosomy of the whole chromosome

10. Furthermore, a common finding in primary glioblastomas (grade IV) is the amplification of the gene for EGF transmembrane receptor (*EGFR*). All these findings are associated with tumour progression and rather poor prognosis of patients.

Interestingly, several studies based on karyotype analysis have shown that the deletion of the short arm of the chromosome 1 and/or of the long arm of the chromosome 19 are recurrently observed in gliomas, particularly in oligodendroglial tumours. These deletions generally involve nearly the whole chromosome arm (Belaud-Rotureau et al., 2006). In oligodendrogliomas, such finding is considered to be a marker of good response to chemotherapy and longer progression-free (PFS) and/or overall survival (OS).

Non-random losses of the genetic material from chromosome 1 (especially telomeric parts of short arms) were detected in a wide range of tumour diseases, from various types of solid tumours to leukaemias and myeloproliferative diseases, which gives evidence of the fundamental role of alterations of chromosome 1 in the pathogenesis of neoplasias. It is therefore expected that the 1p region contains one or more candidate tumour suppressor genes although they have not been precisely determined so far. In glioma, allelic losses in the 1p36 region most frequently occur between the genetic markers D1S1612 and D1S468 (Smith et al., 2000). The deletion of 1p36 is relatively rare in astrocytomas, but it is often found in anaplastic oligodendrogliomas, in which it is associated with higher sensitivity to chemotherapy and prolonged survival (Ino et al., 2001). On the contrary, deletions of 19q were described in all three glial subtypes, with minimum deleted regions defined in the locus 19q13.3 (D19S412-D19S596). In other malignancies, deletions of 19q are relatively rare, although they have been described, for example, in acute lymphocytic leukaemia, lung cancer or familial breast cancer. Therefore, it can be assumed that the 19q13.3 region includes a candidate tumour suppressor gene specific for gliomas (Smith et al., 1999). Concerning prognosis in gliomas, the finding of combined deletions of regions 1p36 and 19q13.3 is especially important for patients with anaplastic oligodendrogliomas and is a predictor of good response to chemotherapy and longer overall survival in patients treated with the PCV (procarbazine, lomustine, vincristine) regimen (Smith et al., 2000; Ino et al., 2001). Combined 1p36/19q13.3 losses have been mostly observed in oligodendrogliomas (50–93 % cases), less frequently in oligoastrocytomas (9–58 % of cases) and very rarely in astrocytomas (<10 % of cases) (Fuller et al., 2003).

Over the last few years, certain molecular cytogenetic and molecular genetic techniques have been developed and applied to the workup of gliomas and, in some instances, they have become a routine part of the evaluation process. Besides polymerase-chain reaction

(PCR)-based strategies for detection of loss of heterozygosity (LOH), genetic alterations may potentially be detected by both basic molecular cytogenetic techniques FISH and/or CGH. I-FISH with specific DNA probes in paraffin-embedded tissues is a classical technique for analysis of chromosomal aberrations in brain tumour cells. However, one major limitation of this method is nuclear truncation in tissue sections, complicating evaluation and interpretation of hybridization results (Gelpi et al., 2003). To circumvent the problem of signal truncation, we analysed the 1p and 19q status in 16 samples of oligodendroglial neoplasms (4x oligodendrogliomas, grade II; 10x anaplastic oligodendrogliomas, grade III; 2x anaplastic oligoastrocytomas, grade III) using I-FISH on isolated whole tumour cell nuclei, prepared from fresh non-fixed tumour tissue samples, resuspended in media and processed using a standard cytogenetic procedure.

This approach yielded interpretable results in 15 cases out of 16 analysed (94 %). Molecular cytogenetic analysis was uninformative in one patient only due to a non-adequate tissue specimen (No. 4). Combined deletion of 1p36 and 19q13.3 regions was proved in 13 patients, eight with anaplastic oligodendroglioma, two with anaplastic oligoastrocytoma, and four with oligodendroglioma. Besides 1p36/19q13 deletions additional genetic alterations typical for high-grade astrocytoma were found in six of them. These findings could have negative influence on the prognosis of the disease. Recurrence or tumour progression appeared in five of these cases.

Deletion of the 9p21 region was e.g. proved in tumour tissue of patient No. 1. with original diagnosis of well-differentiated oligodendroglioma (grade II), in whom the tumour recurred three times and progressed to anaplastic oligodendroglioma (grade III). *CDKN2A*, a tumour suppressor gene on chromosome 9p21 encoding the *p16* protein, is homozygously deleted in a subset of previously reported anaplastic oligodendrogliomas and is considered a negative prognostic factor. The same 9p21 region is also similarly deleted in the majority of anaplastic astrocytomas and glioblastomas, suggesting that it is rather associated with high-grade gliomas in general than with a specific glial lineage. Analogously to our findings, the loss of *p16* has also been associated with progression from well-differentiated to anaplastic oligodendroglioma (Fallos et al., 2004).

In patient No. 13 with original diagnosis of oligodendroglioma, we found *EGFR* amplification, a typical finding in primary glioblastoma multiforme. This patient showed two tumour recurrences 11 and 8 months after previous surgery, respectively. Moreover, in three cases (Nos. 3, 7, 9) polysomy of chromosome 7 was proved, in which the *EGFR* gene is located.

In other two cases with anaplastic oligodendroglioma monosomy of chromosome 10 was detected. In this chromosome, tumour suppressor gene *PTEN* is

located in the 10q23.3 region, which encodes dual lipid-protein tyrosin phosphatase (Li et al., 1997). Its deletion or inhibitory mutation occurs during progression in approximately 40% of high-grade gliomas, in particular primary and secondary glioblastomas.

10q deletions and *EGFR* amplifications are sufficiently rare in pure oligodendrogliomas to suggest the possibility of alternate diagnoses, such as glioblastoma or other astrocytic tumours. This glioblastoma variant displays considerable morphologic overlap with anaplastic oligodendrogliomas, including nuclear uniformity, clear perinuclear halos, a rich capillary network, and/or microcalcification. Identifying *EGFR* amplification in only one of our cases suggests that such a finding is even rarer in oligodendroglial tumours than 10q losses (Fallos et al., 2004).

We can conclude that I-FISH on isolated whole tumour cells nuclei is a sensitive method for detection and interpretation of specific chromosomal aberrations in brain tumour specimens. In patients with oligodendroglioma, it is the essential part of diagnostics and it considerably influences treatment and prognosis. Further studies will be necessary to identify the real prognostic significance of additional chromosomal aberrations in patients with oligodendroglial tumours and combined 1p36/19q13 deletions.

References

- Belaud-Rotureau, M. A., Meunier, N., Eimer, S., Vital, A., Loiseau, H., Merlio, J. P. (2006) Automatized assessment of 1p36-19q13 status in gliomas by interphase FISH assay on touch imprints of frozen tumours. *Acta Neuropathol.* DOI 10.1007/s00401-005-0001-4.
- Coweli, J. K., Barnett, G. H., Nowak, N. J. (2004) Characterization of the 1p/19q chromosomal loss in oligodendrogliomas using comparative genomic hybridization arrays (CGHa). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **63**, 151-158.
- Fallos, K. B., Palmer, Ch. A., Roth, K. A., Nabors, L. B., Wang, W., Carpenter, M., Banerjee, R., Forsyth, P., Rich, K., Perry, A. (2004) Prognostic value of 1p, 19q, 9p, 10q and *EGFR*-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **63**, 314-322.
- Fuller, C. E., Schmidt, R. E., Roth, K. A., Burger, P. C., Scheithauer, B. W., Banerjee, R., Trinkaus, K., Lytle, R., Perry, A. (2003) Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in morphologically ambiguous gliomas with hybrid oligodendroglial/astrocytic features. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 1118-1128.
- Gelpi, E., Ambros, I. M., Birner, P., Luegmayr, A., Drlicek, M., Fischer, I., Kleinert, R., Maier, H., Huemer, M., Gatterbauer, B., Anton, J., Rossler, K., Budka, H., Ambros, P. F., Hainfellner, J. A. (2003) Fluorescent in situ hybridization on isolated tumour cell nuclei: a sensitive method for 1p and 19q deletion analysis in paraffin-embedded oligodendroglial tumour specimens. *Mod. Pathol.* **16**, 708-715.
- Godard, S., Getz, G., Delorenzi, M., Farmer, P., Kobayashi, H., Desbaillets, I., Nozaki, M., Diserens, A. C., Hamou, M. F., Dietrich, P. Y., Regli, L., Janzer, R. C., Bucher, P., Stupp, R., de Tribolet, N., Domany, E., Hegi, M. E. (2003) Classification of human astrocytic gliomas on the basis of

- gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res.* 63, 6613-6625.
- Ino, Y., Betensky, A., Zlatescu, M. C., Sasaki, H., Macdonald, D. R., Stemmer-Rachamimov, A. O., Ramsay, D. A., Cairncross, J. G., Louis, D. N. (2001) Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. *Clin. Cancer Res.* 7, 839-845.
- Isola, J., deVries, S., Chu L., Ghazvini, S., Waldman, F. (1994) Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumour samples. *Am. J. Pathol.* 145: 1301-1308.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz D., Gray J. W., Waldman F., Pinkel D. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumours. *Science* 258, 818-821.
- Kelley, T. W., Tubbs, R. R., Prayson, R. A. (2005) Molecular diagnostic techniques for the clinical evaluation of gliomas. *Diagn. Mol. Pathol.* 14, 1-8.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., Parsons, R. (1997) PTEN, a putative protein tyrosine gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1946.
- Paleologos, N. A., Cairncross, J. G. (1999) Treatment of oligodendroglioma: an update. *Neurooncol.* 1, 61-68.
- Smith, J. S., Alderete, B., Minn, Y., Borell, T., Perry, A., Mohaparta, G., Hosek, S. M., Kimmel, D., O'Fallon, J., Yates, A., Feuerstein, B. G., Burger, P. C., Scheithauer, B. W., Jenkins, R. B. (1999) Localization of common deletions regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene* 18, 4144-4152.
- Smith, J. S., Perry, A., Borell, T. J., Lee, H. K., O'Fallon, J., Hosek, S. M., Kimmel, D., Yates, A., Burger, P. C., Scheithauer, B. W., Jenkins, R. B. (2000) Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas and mixed oligoastrocytomas. *J. Clin. Oncol.* 18, 635-645.

Obsah

1 Neuroimunologie (editor: Eva Havrdová)

1.1 Možnosti fyzioterapie v léčbě roztroušené sklerózy mozkomíšní (Kamila Řasová, Eva Havrdová).....	11
1.2 Stiff-person syndrom (Dana Šišková)	22
1.3 Intravenózní imunoglobuliny v léčbě neuroimunitních onemocnění (Dana Horáková, Eva Havrdová, Jiří Piňha).....	27

2 Neuroonkologie (editor: Petr Kozler)

2.1 Neuroonkologie (Petr Kozler).....	43
2.2 Klasifikace nádorů CNS (Petr Kozler)	45
2.3 Genové abnormality u nádorů centrální nervové soustavy (Filip Kramář, Zuzana Zemanová).....	51
2.4 Biologie meningiomů (Petr Kozler).....	60
2.5 Peritumorální mozkový edém (PTME) (Petr Kozler).....	65
2.6 Léčebné modalitty u nádorů CNS (Petr Kozler, Filip Kramář).....	73
2.7 Chirurgické principy v léčbě nádorů centrální nervové soustavy (Vladimír Beneš).....	80
2.8 Radiochirurgické principy v léčbě nádorů centrální nervové soustavy (Tomáš Chytka).....	87
2.9 Základní principy onkologické léčby nádorů CNS (Ferdinand Třebický)	96

3 Neurogenetika (editor: Alena Zumrová)

Úvod (Alena Zumrová).....	109
3.1 Repeatové choroby	110
3.1.1 Podstata repeatových chorob (Arpád Bóday)	110
3.1.2 Syndrom fragilního X chromosomu (Markéta Havlovicová, Zuzana Mušová)	113
3.1.3 Syndrom premutace fragilního X chromosomu s tremorem a ataxií (Alena Zumrová).....	116
3.1.4 Huntingtonova chorea (Jana Židovská).....	117
3.1.5 Autosomálně dominantní spinocerebelární ataxie (Alena Zumrová)	119

2.3 Genové abnormality u nádorů centrální nervové soustavy

Filip Kramář, Zuzana Zemanová

Léčba mozkových nádorů je často svízelná či neúspěšná. Soudobé možnosti léčby jsou v mnoha případech limitovány a definitivní vyléčení je např. u difúzních gliomů prakticky vyloučeno. V současné době se proto diagnostika těchto onemocnění neomezuje pouze na histologické určení typu a případně gradingu nádoru, ale čím dál více je kladen důraz na strukturální změny genomu nádorových buněk. A ukazuje se, tak jako v jiných oborech, že ve většině případů jsou tyto genetické změny určitým způsobem unifikované a že lze najít typické chromosomální aberace. Ve většině případů nám zatím toto zjištění nepomáhá v léčbě, ale umožňuje určit subtyp nádoru, a tak lépe rozpoznat prognózu příslušného pacienta.

K nejčastějším nádorům centrální nervové soustavy patří difúzní gliomy. Jedná se o heterogenní skupinu tumorů různých histologických subtypů, které se od sebe navzájem liší odezvou na léčbu a prognózou onemocnění. Do této skupiny patří jednak astrocytomy, které se dále dělí na nízkostupňové astrocytomy (low-grade astrocytoma;

WHO grade II), anaplastické astrocytomy (anaplastic astrocytoma; WHO grade III), primární a sekundární glioblastomy (glioblastoma multiforme; WHO grade IV). Dále sem patří oligodendrogliomy a oligoastrocytomy (WHO grade II-III). Léčba difúzních gliomů je problematická, protože vzhledem k jejich difúznímu charakteru růstu nemůže být nikdy radikální, při chirurgickém výkonu se nedaří nádorovou tkáň zcela odstranit. Proto i u tumorů nižších stupňů dochází k relapsu, upgradingu a progresi onemocnění. Shodně s literaturou a i podle našich zkušeností dosahuje mortalita nemocných s difúzními gliomy vyšších stupňů (III, IV) během prvního roku po stanovení diagnózy až 80 %. Optimální léčebná modalita, která by zásadním způsobem ovlivnila osud nemocných s těmito typy nádorů, nebyla dosud nalezena. V současné době existuje shoda, že chirurgická léčba v kombinaci s „tradiční onkologickou léčbou“ nevede ke zlepšení osudu nemocných. Naopak se předpokládá, že metodou volby by měla být léčba založená na znalostech genetických alterací u jednotlivých ná-

dorů. V poslední klasifikaci mozkových nádorů, garantované WHO a publikované v r. 2000, je zdůrazněn význam změn genetické informace jak pro nádorovou progresi, tak pro možnost terapeutickým způsobem tyto genetické změny opravit.

K nejčastějším (představují asi 1 % všech malignit) a zároveň i nejmalignejším formám mozkových nádorů patří anaplastické astrocytomy (průměrná délka přežití 53 měsíců) a glioblastomy (průměrná délka přežití 12 měsíců). Glioblastomy vznikají ve většině případů *de novo* bez předchozího průkazu méně maligní prekursorové léze (primární glioblastom), nebo se mohou vyvinout z nízkostupňového nebo anaplastického astrocytomu (sekundární glioblastom). Rozlišení gliálních subtypů založené pouze na jaderné a buněčné morfologii je subjektivní a jednotlivé subtypy nelze odlišit ani pomocí specifických imunohistochemických markerů. Proto je nezbytné hledat nové diagnostické a prognostické ukazatele, které by umožnily stratifikaci léčby a vedly tak ke snížení morbidity a mortality nemocných. V odborné literatuře byly publikovány první údaje o možnostech molekulárně-genetické a molekulárně-cyto genetické diagnostiky těchto nádorů a byly identifikovány oblasti genomu, v nichž dochází ke genovým mutacím, ztrátě heterozygosity, případně k delecím či amplifikacím celých chromosomových oblastí.

U difúzních gliomů je často popisována např. **delece genu p53** lokalizovaného na krátkých raménkách chromosomu 17 v oblasti 17p13.1. Gen p53 patří do skupiny tumor-supresorových genů a je zároveň nejčastěji mutovaným genem u všech typů nádorových

onemocnění. Kóduje informaci pro protein o molekulové hmotnosti 53 kDa, který hraje významnou roli v regulaci buněčného cyklu, buněčné odpovědi na poškození DNA a regulaci apoptózy. p53 je schopen rozpoznat poškozenou DNA a zablokovat společně s PCNA replikaci DNA či buňku zastavit v G1 fázi buněčného cyklu přes indukci p21 (inhibitor cyklin-dependentních kináz). Ztráta genové informace (delece) nebo mutace genu p53 byly detekovány u asi 30–40 % astrocytomů všech tří stupňů, což svědčí o tom, že vyřazení funkce tohoto genu je časná a kritická událost při vzniku astrocytomů. Porucha funkce p53 tak hraje roli jak ve formování nízkostupňových astrocytomů, tak i v jejich progresi směrem k sekundárnímu glioblastomu. Z toho vycházejí i možné budoucí léčebné modalities. Normální adenovirus je schopen syntetizovat tzv. E1B-protein. Tento protein se váže na p53 a blokuje jeho funkci. Tím je virus schopen replikovat svou DNA. Naproti tomu virus s mutantním E1B-proteinem není schopen replikace za přítomnosti p53, ale v nádorových buňkách, kde je p53 defektní či chybí, je virus schopen replikace a zabíjí hostitelskou buňku.

Mutace p53 jsou naopak vzácné u primárních glioblastomů (pouze asi v 10 %). Tento fakt odráží skutečnost, že glioblastom se vyvíjí dvěma odlišnými cestami (primární/sekundární glioblastom). Zde se často na rozvoji nádoru podílí protein **MDM2**. Gen pro MDM2 je lokalizován na chromosomu 12q14.3-q15. MDM2 má všechny znaky transkripčního faktoru, existuje v pěti odlišných variantách, z nichž dvě mají schopnost interakce s p53. Jedním z výsledků této interakce je vyřazení

p53 z vlivu na buněčný růst, a to mechanismem amplifikace MDM2. Tato amplifikace je pozorována v oněch 10 % glioblastomů bez mutací TP53, tj. u primárních glioblastomů, u kterých je naopak amplifikace MDM2 registrovatelná ve více než 50 %.

Přechod z nízkostupňového astrocytomu do anaplastického je často doprovázen delecí na krátkých raménkách chromosomu 9 v oblasti 9p21. V této oblasti je lokalizován další nádorový supresorový gen **p16 (CDKN)**, který má důležitou funkci v regulaci buněčného cyklu a řídí přechod z G1 fáze do S fáze. p16 je protein, který podobně jako p21 blokuje aktivitu cyklin-dependentních kináz (Cdk4/6) a zabráňuje jejich vazbě na cyklin D. Delece p16 byla popsána u přibližně 2/3 všech gliomů vyšších stupňů (anaplastický astrocytom, primární a sekundární glioblastom).

Asi u 1/3 nemocných s vysokostupňovým astrocytomech byla popsána **delece RB1 genu**. Tento nádorový supresorový gen je lokalizován v oblasti 13q14 a kóduje protein o molekulové hmotnosti 107 kDa. Při fosforylaci RB proteinu dochází k uvolnění transkripčního faktoru E2F, s nímž RB protein vytváří komplex, který pak aktivuje geny nutné pro buněčnou proliferaci. Delece RB1 byla poprvé popsána u nemocných s familiárním i sporadickým retinoblastomem, můžeme se s ní však setkat u řady dalších typů solidních nádorů (např. osteosarkom) i hematologických malignit (např. chronická lymfatická leukémie, mnohočetný myelom).

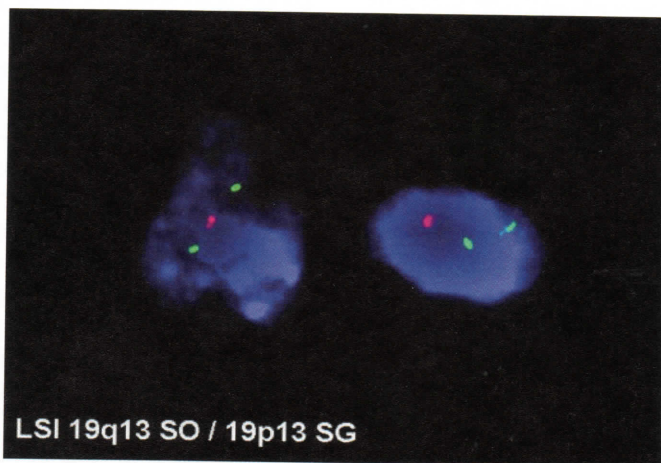
U difúzních gliomů jsou často popisovány i delece v oblastech 1p a 19q. Nenáhodné ztráty genetického materiálu z chromosomu 1 (zejména telo-

merické části 1p) byly detekovány u širokého spektra nádorových onemocnění od různých typů solidních nádorů až po leukémie a myeloproliferativní onemocnění, což svědčí o fundamentální roli alterací chromosomu 1 v patogenezi neoplazií. V oblasti 1p se proto předpokládá přítomnost jednoho nebo více kandidátních tumor-supresorových genů, které se však dosud nepodařilo přesně určit. U difúzních gliomů dochází nejčastěji k **alelickým ztrátám v oblasti 1p36**. Delece 1p36 je poměrně vzácná u astrocytárních tumorů, ale často se vyskytuje u oligodendrogliomů, u kterých je její nález považován za marker dobré odpovědi na chemoterapii a delšího celkového přežití. Naopak **delece 19q** byly popsány u všech tří gliálních subtypů, přičemž minimální deletovaná oblast byla definována v lokusu 19q13.3. U ostatních malignit jsou delece 19q poměrně vzácné, přestože již byly popsány např. u akutní lymfatické leukémie, karcinomu plic nebo familiárního karcinomu prsu. Proto lze v oblasti 19q13.3 předpokládat přítomnost kandidátního tumor-supresorového genu specifického právě pro difúzní gliomy. Z hlediska prognózy je u difúzních gliomů významný zejména nález kombinované **delece oblastí 1p36 a 19q13.3**, který je charakteristický pro nemocné s oligodendrogliomy a je u těchto pacientů prediktorem dobré chemoterapeutické odpovědi (trojkombinace PCV – prokarbazin, CCNU, vinkristin) a delšího celkového přežití.

Pro primární glioblastomy je charakteristická amplifikace genu pro transmembránový receptor **EGFR** (Epidermal Growth Factor Receptor). Tento gen je normálně lokalizován v ob-



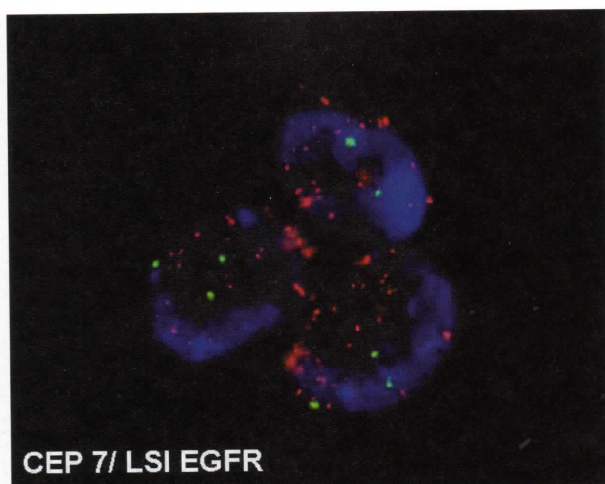
Obr. 2.3/1 Delece 1p36 (červený signál)



Obr. 2.3/2 Delece 19q13 (červený signál)

lasti 7p13p12. Protein EGFR je transmembránový receptor, tvořený třemi podjednotkami. Má vnější vazebnou část, transmembranózní část a cytoplazmatickou část. Je součástí skupiny 4 receptorů [EGFR (HER1 nebo ErbB1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) a ErbB4 (HER4)]. S těmito ostatními receptory může tvořit tzv. heterodimer nebo dva EGFR proteiny vytvářejí ho-

modimer. Aktivovaný EGFR je schopen aktivovat tyrosinkinázu, která aktivuje v jádře produkci cyklinu D, a tím stimulovat buňku k růstu a dělení. K jeho amplifikaci dochází v nádorových buňkách asi 30–60 % nemocných s primárními glioblastomy, a to nejčastěji v podobě extrachromosomálních fragmentů (double minutes) s vysokým počtem genových kopií. Podle někte-



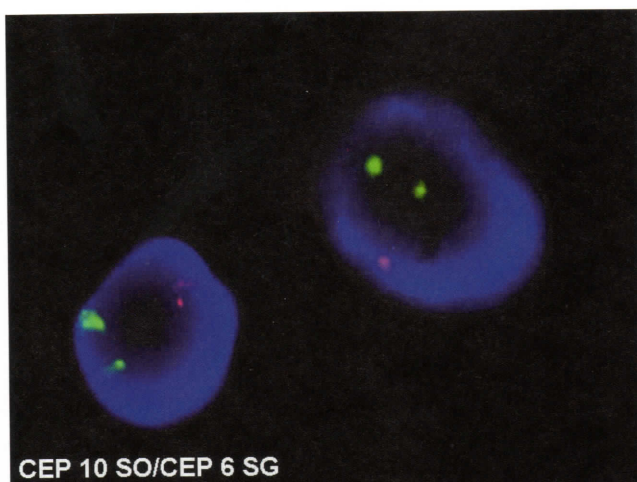
Obr. 2.3/3 Amplifikace genu pro EGFR (červený signál), trisomie 7 (zelený signál)

rých autorů může mít gen EGFR významnou úlohu v difúzní infiltraci glioblastomu do okolních mozkových tkání. V současné době je známa celá řada látek blokujících EGFR či tyrosinkinázu, které postoupily do II. nebo III. fáze klinických zkoušek. Zároveň jsou ale dostupné léky blokující EGFR, které jsou již využívány v léčbě nádorových onemocnění (Iressa – gefitinib v léčbě nemalobuněčných karcinomů plic).

Nestabilita genomu nádorových buněk se u nemocných s mozkovými tumory poměrně často projevuje i vznikem aneuploidii. Podle údajů v literatuře byly aneuploidie prokázány u asi 25–69 % všech astrocytomů. Podle některých autorů jsou nejčastější zejména u primárních glioblastomů, zatímco u sekundárních astrocytomů jsou méně časté. Můžeme se setkávat jak s polyploidii, tak s aneusomiemi jednotlivých chromosomů. Všeobecně se předpokládá, že chromosomové monosomie nebo trisomie souvisí s delecemi resp. amplifikacemi potenciálních onkogenů nebo kandidátních tumor-supreso-

rových genů, které jsou na příslušných chromosomech pravděpodobně lokalizovány. K nejčastějším početním odchylkám v časných stádiích mozkových tumorů patří např. trisomie chromosomu 7, na kterém je mimo jiné umístěn i již zmíněný gen pro EGFR. Naopak při progresi astrocytomů se často objevuje monosomie chromosomu 10. Na tomto chromosomu je v oblasti 10q23.3 lokalizován nádorový supresorový gen PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten, synonymum MMAC1), který kóduje tyrosin/duální specifickou fosfatázu. K jeho delecí nebo inhibiční mutaci dochází u přibližně 40 % vysokostupňových gliomů, zejména primárních i sekundárních glioblastomů. Vrozená mutace PTEN vede k rozvoji Cowdenové choroby (viz níže).

Ependymomy jsou nejméně časté intrinsické mozkové nádory vycházející z nervové tkáně. Vyrůstají z ependymálních buněk, které tvoří stěny mozkových komor a centrálního míšního kanálu. Vyskytují se častěji u dětí. Postihují



Obr. 2.3/4 Monosomie 10 (červený signál)

především oblast 4. komory, krční míchy a míšního konu. Jejich biologické chování je značně odlišné, ale lze obecně říci, že míšní nádory mají lepší prognózu oproti lézím mozkovým. Publikované cytogenetické analýzy rovněž u ependymomů prokázaly některé chromosomální aberace, ale jejich výskyt není tak konstatní ve srovnání s difúzními gliomy. V některých **anaplastických** ependymomech byly prokázány delecce 9p a 13q, což by mohlo znamenat alteraci p16 a RB1. U spinálních tumorů (st. II) byly naopak často nalezeny polysomie. V buňkách těchto nádorů byla často rovněž prokázána delecce 22q, podobně jako u NF2 (viz níže).

Cytogenetické a molekulární genetické vyšetření se uplatňuje i u hereditárních onemocnění charakterizovaných vznikem typů mozkových nádorů.

vším na kůži, ale mohou být postiženy i nervové struktury. Dále to jsou mnohočetné kožní skvrny charakteru café-au-lait, mnohočetné pihy v axilách a v inguinách, hamartomy duhovky a různé kostní léze. Často užívaným synonymem je von Recklinghausenova nemoc. Typickým postižením CNS při NF1 je gliom optiku (histologicky pilocytický astrocytom), který se při NF1 obvykle vyskytuje oboustranně, dále to jsou difúzní infiltrativně rostoucí astrocytomy a glioblastomy. Častějšími klinickými projevy jsou makrocefalie, poruchy intelektu, epilepsie, hydrocefalus, stenóza akveduktu a neuropatie. Byla prokázána specifická genová porucha pro protein neurofibromin (GTPáza). Gen pro tento protein je lokalizován na dlouhém rameni 17. chromosomu (17q11.2).

2.3.1 Neurofibromatóza I. typu

Je charakterizována mimo jiné tvorbou mnohočetných neurofibromů, přede-

2.3.2 Neurofibromatóza II. typu

Neurofibromatóza II. typu (MISME – Multiple Inherited Schwannomas, Me-

ningiomas, Ependymomas), která je podstatně vzácnější než NF1, je autosomálně dominantně dědičné onemocnění. Je charakterizována vznikem oboustranného schwannomu n. VIII. a mnohotným postižením nervových kořenů neurofibromy. Vedle toho jsou častým jevem i míšní ependymomy a meningiomy, méně často pak pilocytický astrocytom. Genová porucha je lokalizována na chromosomu 22q12, protein je nazýván **schwannomin** (merlin). Schwannomin je nádorový supresor, který je zavzat do aktin-cytoskeletárního aparátu. Alterace cytoskeleton je zřejmě prvním krokem v patogenezi některých nádorů.

2.3.3 Von Hippelova-Lindauova choroba

Je rovněž autosomálně dominantně dědičná. U postižených jedinců se vyskytují mnohočetné hemangioblastomy v zadní jámě lební. Postiženým úsekem DNA je chromosom 3p26 pro gen VHL (podjednotka elonginu). Nicméně ne všichni pacienti s mutací VHL genu musí mít hemangioblastomy. Časté jsou rovněž karcinomy ledvin či feochromocytomy. Existují dokonce formy s výskytem pouze feochromocytomu. Jakým způsobem se **protein VHL** (pVHL) podílí na nádorové transformaci zůstává zatím nejasné.

2.3.4 Li-Fraumeni syndrom

Jedná se o onemocnění s autosomálně dominantním způsobem přenosu, které je charakterizováno výskytem mnohotných nádorových onemocnění, pře-

devším sarkomů, karcinomu prsu, ale rovněž mozkových tumorů a hemoblastóz. Ve většině případů Li-Fraumeni syndromu je etiologickým podkladem vrozená mutace **p53**. V malém procentu byla nalezena mutace genu pro **checkpointkinázu 2** (serine/threonine-protein kinase Chk2). Tento gen je lokalizován na 22q12.1. Tato kináza se aktivně účastní na buněčném cyklu a podílí se na zastavení cyklu v G2 v buňkách s poškozenou DNA. Ve více než 13 % se u jedinců s Li-Fraumeni syndromem vyskytují mozkové nádory, nejčastěji se jedná o gliomy astrocytární řady.

2.3.5 Komplex tuberózní sklerózy

Komplex tuberózní sklerózy (TSC) je další z familiárních onemocnění, která postihují rovněž centrální nervovou soustavu. Až v 50 % najdeme pozitivní rodinnou anamnézu, zbytek jsou mutace *de novo*. Jedná se opět o onemocnění s autosomálně dominantním způsobem přenosu s vysokou penetrancí, ale s fenotypovou variabilitou. Genetické studie prokázaly dvě oblasti, které jsou postiženy. Jedná se o mutace v TSC1 na 9q34 a mnohem častější v TSC2 na 16p13.3. Gen TSC1 kóduje protein hamartin, který je exprimován především v mozku, ledvinách a srdci. Gen TSC2 kóduje tuberin. Předpokládá se, že tuberin je nádorový supresor. Oba proteiny v buňce interagují, což vysvětluje prakticky nerozeznatelný klinický obraz obou forem. Mezi nejčastější projevy v CNS patří hamartomy (tubery), subkortikální glioneurální hamartomy, subependymální gliální noduly a subependymální ob-

rovs kobuněčné astrocytomy (WHO grade I).

2.3.6 Turcotův syndrom

Je charakterizován výskytem kolorektálního karcinomu a maligního neuroepiteliálního nádoru (nejčastěji meduloblastomu či glioblastomu). Nejčastěji se objevuje v rámci familiární adenomatózní polypózy (FAP) či syndromu hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (HNPCC). Vyskytuje se ve dvou formách. U Turcotova syndromu typu 1 se vyskytuje glioblastom, někteří pacienti mají HNPCC, ale nemají FAP. Genetickým podkladem je vrozená mutace genů pro hPMS2 (7p22), hMSH2 (2p16) nebo hMLH1 (3p21), které se uplatňují v mechanismu opravy bodových mutací DNA (DNA mismatch repair). Typ 2 je charakterizován výskytem meduloblastomu u pacientů s FAP. Genetickým podkladem je v tomto případě mutace APC genu (5q21). Alterace funkce APC může ovlivňovat pohyblivost a adhezi epiteliálních kmenových buněk ve střevě. Není jasné, zda se podobným způsobem uplatňuje i v prekursorových buňkách mozku.

2.3.7 Naevoid basal cell carcinoma syndrom

Naevoid basal cell carcinoma syndrom (NBCCS) je autosomálně dominantní onemocnění spojené se širokým spektrem vývojových anomálií a predispozicí pro růst benigních a maligních nádorů. Syndrom je způsoben vrozenou mutací genu PTCH na chromosomu 9q22.3. Hlavním klinickým projevem

jsou mnohočetné kožní karcinomy, odontogenní keratocysty a palmární a plantární dyskeratotické dólíčky. V mozku se objevují kalcifikace, bývá makrocefalie a tvoří se některé nádory, dominantně meduloblastom. Tento meduloblastom má stejné mikroskopické a imunohistochemické charakteristiky jako sporadické formy meduloblastomu, nicméně ve většině případů meduloblastomu v rámci NBCCS se jedná o desmoplastickou variantu. Podle některých autorů mají příznivější prognózu než formy sporadické.

2.3.8 Cowdenové choroba

Autosomálně dominantní onemocnění charakterizované různými hamartomy a nádory. Hlavním intrakraniálním projevem choroby je dysplastický gangliocytom mozečku. Dalšími projevy jsou kožní léze a afekce sliznice dutiny ústní, hamartomové polypy tlustého střeva, nádory štítné žlázy a karcinom prsu.

2.3.9 Dysplastický gangliocytom mozečku (Lhermittova-Duclosova choroba)

Benigní mozečková léze postihující mladé jedince, složená z dysplastických gangliových buněk. Lhermitte, Duclos a Spiegel (Lhermitte, Duclos, 1920, Spiegel, 1920) poprvé popsali tuto mozečkovou lézi jako hyperplazii mozečku. Projevuje se ataxií a příznaky nitrolební hypertenze. Nádor postihuje všechny věkové skupiny s maximem kolem 34. roku života. Protože se mozečkový nádor může objevit jako první a před-

cházet další projevy CD, je nutné tyto pacienty dále sledovat, především s ohledem na možnost vzniku karcinomu prsu.

Odpovědný gen PTEN je lokalizován na chromosomu 10q23.3.

Podpořeno grantem

IGA MZ ČR NR 1A/8237-3.

AUTOŘI

Hlavní autor a pořadatel

doc. MUDr. Petr Kozler, Ph.D.

*Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta UK
a Ústřední vojenská nemocnice Praha,
Neurochirurgická klinika*

Autoři

prof. MUDr. Vladimír Beneš, DrSc.

*Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta UK
a Ústřední vojenská nemocnice Praha,
Neurochirurgická klinika*

MUDr. Tomáš Chytka

*Nemocnice Na Homolce, Praha,
Stereotaktická a radiační neurochirurgie*

MUDr. Filip Kramář

*Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta UK
a Ústřední vojenská nemocnice Praha,
Neurochirurgická klinika*

Recenzenti

prof. MUDr. Karel Urbánek, CSc.

*Univerzita Palackého v Olomouci,
Lékařská fakulta UP a Fakultní nemocnice,
Neurologická klinika*

doc. MUDr. Jiří Náhlavský, CSc.

*Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta UK
a Fakultní nemocnice Hradec Králové,
Neurochirurgická klinika*

1.1.3.	Pleomorfni xanthoastrocytom (ICD-O kód: 9424/3, WHO st. II)	64	Etiologie	96
	Histopatologie	66	Prognóza	96
	Genetika	67	1.6. Neuroepitelové nádory nejistého původu ...	96
	Prognóza	67	1.6.1. Astroblastom (ICD-O kód: 9430/3, WHO st. dosud neurčen)	97
1.1.4.	Desmoplastický astrocytom/gangliogliom kojeneckého věku (ICD-O kód: 9493/0, WHO st. I)	67	1.6.2. Chorioidální gliom třetí komory (provizorní ICD-O kód: 9441/1, WHO st. II)	97
1.1.5.	Subependymální obrovskobuněčný astrocytom (ICD-O kód: 9348/1, WHO st. I)	69	1.6.3. Gliomatosis cerebri (ICD-O kód: 9381/3, WHO st. III)	98
1.2. Oligodendrogliální nádory	70	1.7. Neuronální a smíšené neurogliální nádory	99	
1.2.1.	Oligodendrogliom (ICD-O kód: 9450/3, WHO st. II)	70	1.7.1. Gangliocyтом (ICD-O kód: 9492/0, WHO st. I) Gangliogliom (ICD-O kód: 9505/1, WHO st. I, II) Anaplastický gangliogliom (ICD-O kód: 9505/3, WHO st. III, IV)	100
	Histopatologie	71	1.7.2. Dysembryoplastický neuroepitelový nádor (ICD-O kód: 9413/0, WHO st. I)	103
	Genetika	73	1.7.3. Centrální neurocytom (ICD-O kód: 9606/1, WHO st. II)	104
	Prognóza	74	1.7.4. Mozečkový liponeurocytom (ICD-O kód: 9506/1, WHO st. I, II)	105
1.2.2.	Anaplastický oligodendrogliom (ICD-O kód: 9451/3, WHO st. III)	74	1.7.7. Paragangliom (ICD-O kód: 8680/1, WHO st. I)	106
	Histopatologie	74	Paragangliomy – neurochirurgická poznámka	107
	Genetika	74	1.8. Neuroblastové nádory	108
	Prognóza	74	■ Olfaktoriální neuroblastom (ICD-O kód: 9522/3)	108
1.3. Smíšené gliomy	76	1.9. Pineální parenchymové nádory	110	
1.3.1.	Oligoastrocytom (ICD-O kód: 9282/3, WHO st. II)	77	1.9.1. Pinealoblastom (ICD-O kód: 9362/3, WHO st. IV)	110
	Histopatologie	78	1.9.2. Pineocyтом (ICD-O kód: 9361/1, WHO st. II)	111
	Genetika	79	1.9.3. Pineální parenchymový nádor se středním stupněm diferenciacie	112
	Prognóza	79	1.10. Embryonální nádory	112
1.3.2.	Anaplastický oligoastrocytom (ICD-O kód: 9832/3, WHO st. III)	79	1.10.1. Ependymoblastom (ICD-O kód: 9392/3, WHO st. IV)	112
	Histopatologie	79	1.10.2. Meduloblastom (ICD-O kód: 9470/3, WHO st. IV)	114
	Genetika	79	Histopatologie	114
	Prognóza	79	Genetika	116
■ Léčebný postup u gliomů	79	Histogeneze	Prognóza	117
(Filip Kramář)				
Současný algoritmus v diagnostice a léčbě gliomů	83			
Perspektivy léčby maligních gliomů	84			
1.4. Ependymální tumory	84			
1.4.1.	Ependymom (ICD-O kód: 9391/3, WHO st. II)	85		
	Histopatologie	88		
	Genetika	89		
	Prognóza	90		
1.4.2.	Anaplastický ependymom (ICD-O kód: 9392/3, WHO st. III)	91		
1.4.3.	Subependymom (ICD-O kód: 9383/1, WHO st. I)	91		
1.5. Nádory chorioidálního plexu	92			
■ Papilom chorioidálního plexu (ICD-O kód: 9390/0, WHO st. I) Karcinom chorioidálního plexu (ICD-O kód: 9390/3, WHO st. III)	92			
Histopatologie	93			

Genetika

Molekulární genetické alterace vedoucí k onkogenezi a progresi oligoastrocytomů jsou více heterogenní, než je tomu u čistých oligodendrogliomů. Na druhé straně ale nebyly nalezeny žádné konzistentní abnormality specifické pouze pro oligoastrocytomy, jinými slovy genetický podklad je stejný jako u skupiny oligodendrogliomů a astrocytomů. Kolem 30–50 % oligoastrocytomů má LOH na chromosomu 19q a 1p. Kolem 30 % oligoastrocytomů nese genetické alterace, které jsou časté u astrocytárních tumorů – mutace genu *TP53* a/nebo LOH na 17p. Je zajímavé, že oligoastrocytomy s uvedenými alteracemi (mutace *TP53* a LOH 17p) nemají LOH na 1p a 19q a vice versa (Reifenberger et al., 1994).

Navíc podskupina oligoastrocytomů s delecí 1p a 19q má více rysů oligodendrogliomů, zatímco u nádorů s mutacemi genu *TP53* dominují rysy astrocytomové (Maintz et al., 1997). Z výše uvedeného tedy vyplývá, že nádory, které jsou morfologicky klasifikovány jako oligoastrocytomy, jsou geneticky heterogenní skupinou. Jedna podskupina vypadá geneticky příbuzná s oligodendrogliálními tumory, zatímco druhá s difúzními astrocytomy. Biologický základ přítomnosti dvou odlišných gliálních fenotypů v jednom každém oligoastrocytomu bude nutně ještě objasnit.

Prognóza

Průměrná délka přežití se uvádí 6,3 roky, pětileté přežití je u 58 % a desetileté přežití u 32 % pacientů.

Faktory spojené s lepší prognózou jsou nižší věk v době operace (pod 37 roků), radikální resekce a pooperační aktinoterapie (Shaw et al., 1994). Při porovnání bifázické varianty s difúzní nejsou výsledky jednoznačné. Zatímco někteří autoři nenacházejí signifikantní rozdíly v prognóze (Hart et al., 1974), jiní uvádějí lepší prognózu u bifázických oligoastrocytomů (Shimada et al., 1997).

1.3.2. Anaplastický oligoastrocytom

(ICD-O kód: 9832/3, WHO st. III)

Jde o oligoastrocytom s histologickými rysy malignity, jako je zvýšená buněčnost, jaderná atypie, pleomorfismus a zvýšená mitotická aktivita.

V současné době nejsou pro tento typ nádoru k dispozici přesná epidemiologická data, v jediné publikované sestavě supratentoriálních anaplastických gliomů představuje anaplastický oligoastrocytom 4 % (Winger et al., 1989). Průměrný věk v době

operace se uvádí 45 roků a je lehká převaha mužů (M:Ž = 1,3:1). Nádor roste obvykle supratentoriálně s predominantním postižením frontálního a temporálního laloku. Anamnéza je obvykle velmi krátká, někdy však může jít o reoperaci po řadě let, tedy o předchozí existenci gliomu nižšího stupně. Při MR vyšetření dochází ke zvýšení signálu po podání gadolinia (obr. 49.).

Histopatologie

Anaplastický oligoastrocytom je astrocytom s typickými rysy malignity, které mohou být přítomny v obou buněčných komponentách nebo jenom v jedné z nich (obr. 50.).

Genetika

Genetické abnormality vedoucí k progresi do vyššího stupně jsou stejné jako u oligodendrogliomů a astrocytomů – LOH na 9p, homozygotní delecce *CDKN2A* a delecce na chromosomu 10 a 11p. Vzácnější je amplifikace *EGFR* genu (Reifenberger et al., 1994).

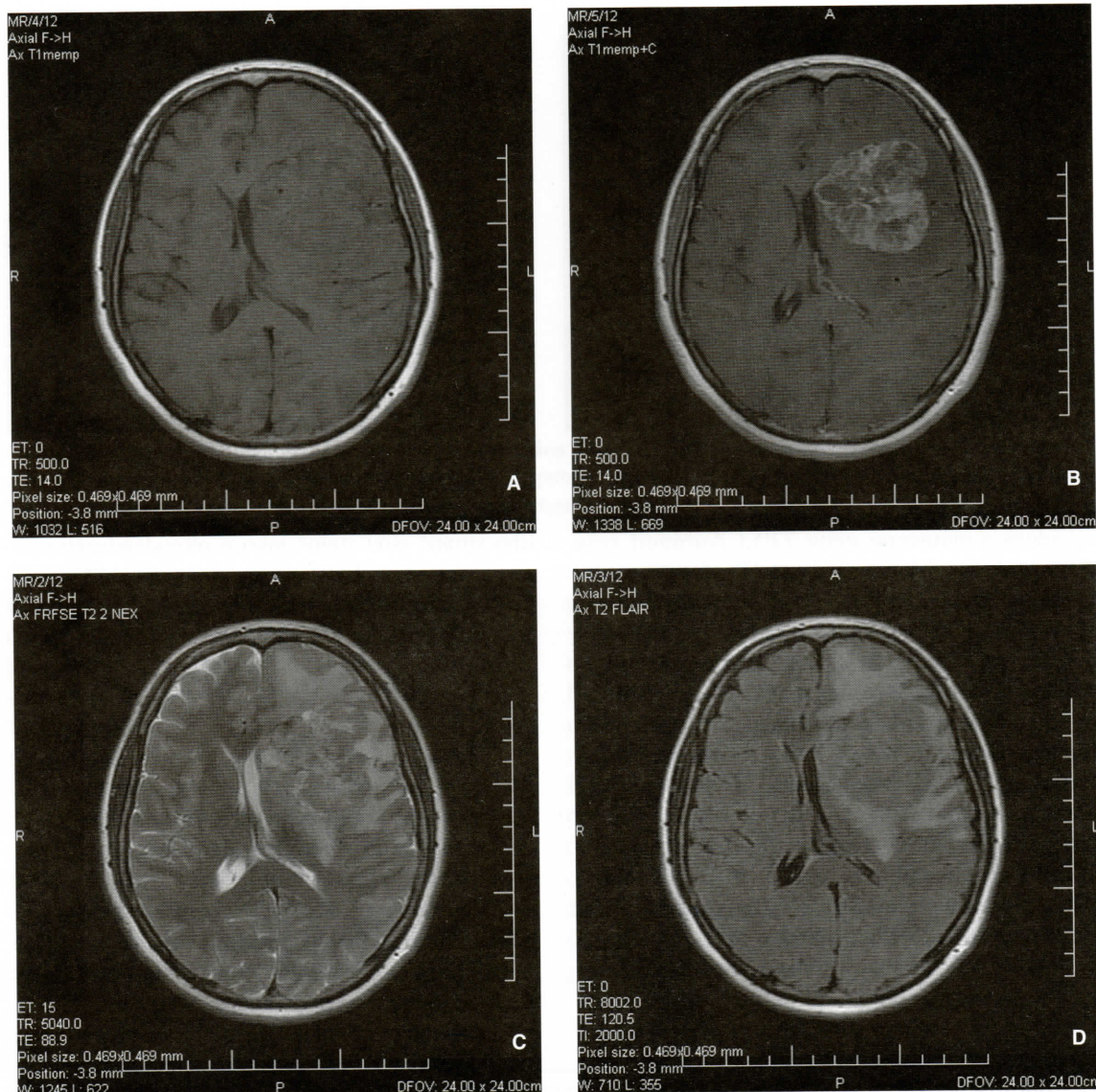
Prognóza

Prognóza je relativně špatná, ale vždy značně lepší než u klasického glioblastomu. Průměrná délka přežití je 2,8 roku s pětiletým přežitím ve 36 % a desetiletým přežitím v 9 % u pacientů léčených operací a pooperační aktinoterapií (Shaw et al., 1994). V sestavě nemocných léčených kromě operace a aktinoterapie ještě chemoterapií v kombinaci PCV je střední délka přežití delší – 49,8 měsíce (Kim et al., 1996). Jiná sestava (Donahue et al., 1997) uvádí lepší prognózu anaplastického oligoastrocytomu oproti »čistému« anaplastickému astrocytomu.

■ Léčebný postup u gliomů

Pro astrocytární a oligodendrogliální tumory se z praktického hlediska stále užívá název »gliomy«, který je tradiční a jeho používání v multidisciplinárním přístupu k léčbě je výhodné.

První gliom resekoval na základě neurologického vyšetření Godlee ve spolupráci s Bennettem v roce 1884 (Bennett, Godlee, 1884; Jackson, 1885). Do té doby byly indikací k operaci nádorů změny na kalvě, především hyperostózy u meningiomů. Zobrazovací metody se vyvíjely v průběhu celého minulého století (PEG – 1918, AG – 1927/1931, CT – 1972, MR – 1979). V současné době je suverénní diagnostickou metodou u gliomů MR, eventuálně doplněná funkčním MR vyšetřením (fMR) a PET.



Obr. 49. Anaplastický oligoastrocytom st. III, T1 obraz bez kontrastní látky (A) a po jejím podání (B), T2 obraz (C) a FLAIR (D)

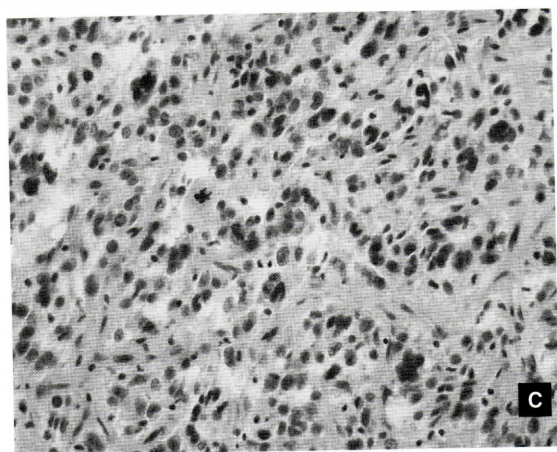
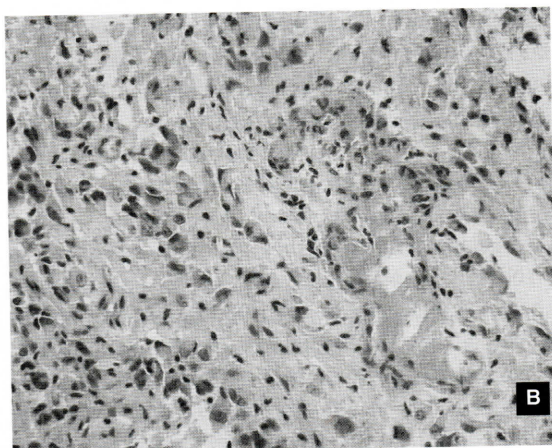
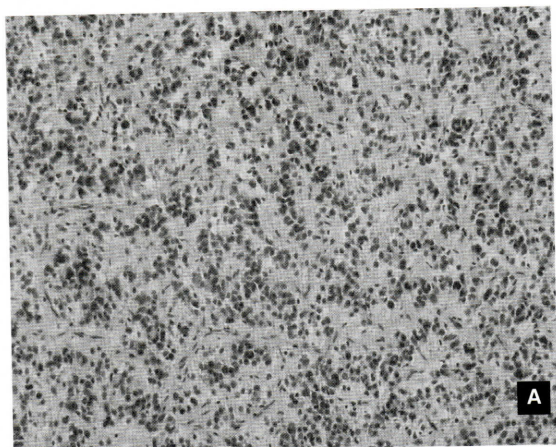
Tento soubor zobrazovacích metod přináší dostatečné informace nejenom o přesné lokalizaci gliomu, ale většinou též o stupni malignity podle WHO gradingu.

Z léčebných modalit se u gliomů užívají tři, uvedené v pořadí se sestupným efektem – chirurgická léčba, radiační léčba a chemoterapie. Tyto modalitty, prakticky vždy užívané v kombinaci, však gliomy »neléčí«, pouze prodlužují přežití.

Operační léčba využívající diagnostické možnosti (MR, fMR, PET), plánování operace pomocí navigačních systémů a peroperačního elektrofyziologického monitorování funkcí, je v současné době

bezpečná, uvádí se mortalita 1 % a pooperační neurologická morbidita, tj. progresse neurologické symptomatologie, 5 % včetně glioblastomu. Tyto excelentní výsledky však u gliomů nijak výrazně neovlivňují celkový výsledný stav, protože nepostihují biologickou podstatu nádoru. Přestože neexistují velké srovnávací studie, ukazuje se, že »radikální« resekce zajišťuje pacientovi lepší kvalitu života a delší přežití než pouhá biopsie za účelem histologické verifikace nádoru k následné onkologické léčbě (Sawaya, 1999).

Radiační terapie se dnes užívá frakcionovaně, aby se minimalizoval její destrukční podíl. Jednotlivé



Obr. 50. Anaplastický oligoastrocytom st. III, barvení hematoxylin-eosinem (A–C)

frakce (180 cGy) se aplikují během šestitýdenní periody do celkové dávky 60 Gy cíleně na oblast nádoru plus 2–3 cm okolní tkáň. Kvalitativně jinou modalitou radiační terapie je neutronová zachytová terapie, která vychází z předpokládaného zničení nádorových buněk bez současného poškození zdravé mozkové tkáně. Použití této metody je podmíněno existencí dostatečně intenzivního zdroje termálních neutronů a vhodné borové sloučeniny, která by se ukládala v nádorových buňkách, přičemž v okolní zdravé tkáni by její koncentrace byla minimální. Expozicí nádorové tkáně obsahující borovou sloučeninu obohacenou stabilním izotopem ^{10}B svazkem termálních neutronů dojde k selektivní destrukci buněk, které v okamžiku ozáření tepelnými neutrony tento izotop obsahují. Metodě je věnována velká a soustavná pozornost jak z hlediska experimentálního, tak i z hlediska klinického zkoušení (Yang et al., 1996 a 1997; Barth et al., 1999; Goodman et al., 2000). Ukazuje se, že problematickým bodem metody je vhodná borová sloučenina, která musí prostupovat v dostatečné koncentraci hema-

toencefalickou bariérou, pomocí specifických molekulárních receptorů se vázat pouze na nádorové buňky a zcela šetřit buňky zdravé. Protože dosud borová sloučenina s těmito parametry není k dispozici, nelze metodu v klinické praxi používat (Gutin, Posner, 2000). O »užitečnosti« této metody vypovídá i »česká cesta« jejího výzkumu. Zatímco Kunc ve své učebnici z roku 1983 píše: »...a jsou perspektivy, že metoda bude zařazena do léčebné praxe«, konstatují o dvacet let později jeho následovníci, že »cílem projektu v této první fázi klinické studie není léčba nemocného, ale stanovení bezpečné dávky BSH (sodium borocaptate – $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) a intenzity ozařovacího svazku neutronů« (Dbalý et al., 2003).

Chemoterapie by teoreticky měla být optimálním způsobem léčby maligních gliomů, jejichž biologickou vlastností je infiltrativní a invazivní růst do mozkové tkáně s množstvím gliomových buněk rozestých i velmi daleko od původního nádorového ložiska. V tuku rozpustné terapeutikum, které v dostatečné koncentraci přestupuje hemoencefalickou

bariéru, by mohlo ovlivnit jakoukoli nádorovou buňku kdekoli v mozku. Bohužel žádné dosud známé cytostatikum (nebo jejich kombinace) takto nepůsobí. To má několik příčin:

1. většina cytostatik je rozpustná pouze ve vodě a jejich průniku do mozku v dostatečné koncentraci brání hematoencefalická bariéra;
2. biochemické rozdíly mezi normální buňkou a gliomovou buňkou jsou malé, takže vysoké dávky cytostatika, které by bezpečně eradikovaly všechny nádorové buňky, poškozují i buňky normální;
3. genetické a biochemické abnormality, které umožňují chemosenzitivitu, vykazuje jenom určitá část nádorové buněčné populace, nikoli homogenně celý nádor (například ne všechny buňky glioblastomu exprimují abnormální EGFR nebo mutovaný p53).

Existují různé protokoly pro chemoterapii gliomů, které jsou upravovány na základě výsledků soustavně probíhajících klinických zkoušek. V poslední době se objevilo nové alkylační cytostatikum, které je používáno v léčbě maligních gliomů, především glioblastomů. Jedná se o temozolomid. Temozolomid je chemicky 8-karbomoyl-3-methylimidazo-[5,1-*d*]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-on. Empirický vzorec je $C_6H_6N_6O_2$. Jeho velkou výhodou je stabilní farmakokinetika s minimální variabilitou u jednotlivých pacientů, dobrá tolerance a perorální aplikace. Největším rizikem je myelosuprese, především redukce počtu leukocytů a trombocytů. Temozolomid dobře proniká hematoencefalickou bariérou, dosahuje cca 30% penetrace do mozkomíšního moku. Principem jeho cytotoxického účinku je vznik methylovaných nukleotidů v DNA, především N⁷-methylguanin, N³-methylguanin a O⁶-methylguanin (O⁶-MG). Ačkoli O⁶-MG představuje jen cca 5 % z nukleotidů methylovaných temozolomidem, sehrává kritickou úlohu v protinádorové aktivitě tohoto léku. Neschopnost DNA reparačních enzymů nalézt vhodnou komplementární bázi pro O⁶-MG má za následek vznik početných zlomů v řetězci DNA. Výsledná poškozená DNA nemůže nadále podporovat buněčný růst a replikaci a iniciuje proces buněčné apoptózy.

Buňka se samozřejmě snaží o opravu DNA mechanismem reparace chybného párování. O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferáza (MGMT) je cytosolický a jaderný enzym, který odstraňuje methylovou skupinu z polohy O⁶ guaninu. Jedná se o protein, který je produktem genu *MGMT* na 10q26. V současné době je snahou inhibovat tento enzym

nebo dosáhnout jeho deplece. Především deplece O⁶-MGMT pomocí O⁶-benzylguaninu prokázala významnou účinnost, a to především ve studiích *in vivo*.

V březnu 2005 byla publikována multicentrická randomizovaná studie léčby glioblastomů (Stupp et al., 2005). Tato studie randomizovala pacienty buď pro standardní **radioterapii** (frakcionovaná cílená iradiace v denních frakcích po 2 Gy 5krát týdně po dobu 6 týdnů do maximální dávky 60 Gy) nebo pro **radioterapii plus** kontinuální denní dávku **temozolomidu** (75 mg na m² tělesného povrchu a den, 7 dní v týdnu od prvního do posledního dne radioterapie), následovanou 6 cykly adjuvantního podávání **temozolomidu** (150–200 mg na m² tělesného povrchu po dobu 5 dní během každého 28denního cyklu). Primárním sledovaným cílem studie bylo přežití pacientů.

Celkem bylo do této studie zařazeno 573 nemocných (pouze radioterapie – 286 pacientů, konkomitanti chemoradioterapie s temozolomidem – 287 pacientů) z 85 center. Průměrný věk pacientů zařazených do studie byl 56 let. Z celkového počtu 84 % nemocných podstoupilo operační výkon. V obou skupinách byla léčba započata v průměru 5 týdnů od stanovení diagnózy. Z celkového počtu 287 nemocných ve skupině radioterapie plus temozolomid dokončilo léčbu, jak byla plánována, 85 % zařazených pacientů. Podávání temozolomidu bylo přerušeno u 37 nemocných pro jeho toxicitu, u 11 pacientů bylo podávání zastaveno pro progresi onemocnění, z jiných důvodů u 12 nemocných. Během 28měsíčního follow-up od první randomizace zemřelo 480 (84 %) nemocných. Medián přežití dosahoval u skupiny radioterapie plus temozolomid 14,6 měsíců, ve skupině radioterapie bez temozolomidu to pak bylo 12,1 měsíců. Dvouletého přežití dosáhlo 26,5 % nemocných ve skupině radioterapie plus temozolomid a 10,4 % ve skupině samotné radioterapie. Hematotoxicita konkomitantiho režimu radioterapie a temozolomidu dosáhla stupně 3 a 4 u 7 % nemocných.

Závěrem je možno říci, že spojení podávání temozolomidu s radioterapií u pacientů s glioblastomy vedlo ke statisticky signifikantnímu a klinicky smysluplnému prodloužení přežití. Z těchto důvodů by měl být režim konkomitantiho radioterapie s temozolomidem brán jako základní srovnávací protokol pro nové léčebné režimy pro léčbu maligních gliomů.

Dosažené celkové výsledné stavy (outcome) a délky přežití (survival) u maligních gliomů dovo-

lují v současné době považovat za prokázané, že pouze cytostatikum temozolomid v kombinaci s radioterapií má lepší efekt než BCNU (jedinou výjimkou je patrně kombinace PCV u anaplastických oligodendrogliomů). Základem chemoterapie maligních gliomů je tedy v současné době p.o. aplikace temozolomidu v dávce 75 mg/m² 5 dnů v týdnu až do skončení radioterapie do dávky 60 Gy, poté následuje šest cyklů adjuvantního podávání temozolomidu (150–200 mg na m² tělesného povrchu po dobu 5 dní během každého 28denního cyklu).

Současné se studií, která prokázala signifikantně vyšší účinnost léčby konkomitantní chemoradioterapií s temozolomidem, byla rovněž opublikována práce, která sledovala četnost výskytu hypermethylace promotoru *MGMT* a která si dala za cíl porovnat účinnost léčby temozolomidem v závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti hypermethylace *MGMT* u stejné skupiny nemocných. Methylace-specifická PCR byla provedena u celkem 307 z 573 vzorků tkáně glioblastomu. Ve 206 případech byl výsledek dostatečně vypovídající, aby bylo možno určit, zda je promotor *MGMT* methylován či nikoli. V 92 případech byla methylace nalezena, ve 114 promotor methylován nebyl.

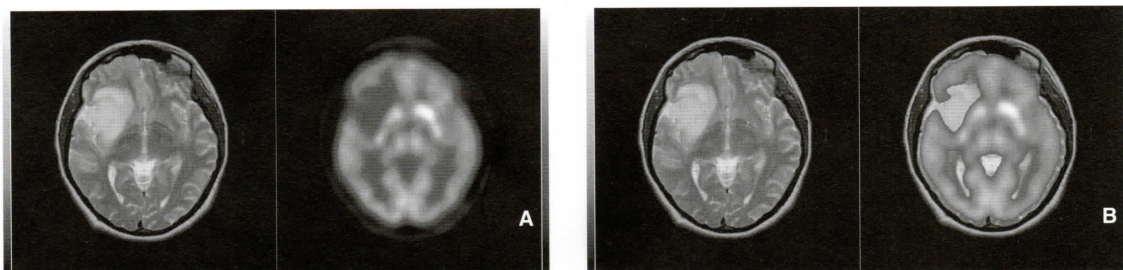
Pro celou skupinu 206 pacientů s identifikovaným promotorem *MGMT* platilo, že byl signifikantní rozdíl, bez ohledu na léčbu, v celkovém přežití mezi skupinou s methylací a bez methylace promotoru *MGMT*. Medián přežití u pacientů s methylací promotoru dosáhl 18,2 měsíce, narozdíl od skupiny bez methylovaného promotoru *MGMT*, kde medián přežití dosáhl pouze 12,2 měsíce. Pokud byl nález methylace vztažen i k léčebnému postupu (tj. konkomitantní chemoradioterapie temozolomidem s následnou adjuvantní léčbou temozolomidem versus samotná radioterapie), pak nejdelšího mediánu přežití – 21,7 měsíce – dosáhla skupina nemocných s methylací promotoru *MGMT*, kteří byli zároveň randomizováni do skupiny konkomitantní chemoradioterapie. Dvouletého přežití v této skupině dosáhlo 46 % pacientů, oproti 22,7 % nemocných s methylací *MGMT* promotoru, kteří byli randomizováni do větve radioterapie bez temozolomidu (Hegi et al., 2005). Tyto údaje naznačují, že stav methylace *MGMT* promotoru může mít určitý prognostický význam, zároveň může být určujícím parametrem účinnosti temozolomidu v léčbě maligních gliomů, nepřítomnost methylace *MGMT* promotoru značí pouze malý nebo dokonce žádný prospěch z léčby temozolomidem, pokud bychom

se nepokusili *MGMT* depletovat např. O⁶-benzylguaninem.

Současný algoritmus v diagnostice a léčbě gliomů

Algoritmus je soubor obecných zkušeností, které, jsou-li aplikované na určitou, přesně definovanou entitu, umožňují logické řazení jednotlivých diagnostických a léčebných kroků v čase, aniž by byl jakkoli potlačen základní postulát individuálního přístupu ke každému jednotlivému pacientovi.

U gliomů lze algoritmus v tomto smyslu charakterizovat takto: pacientovi byla provedena MR mozku pro podezření na gliom. V T1 obraze je hypointenzní léze, která nezvyšuje signál po podání gadolinia. Ložiskový neurologický nález je normální a pacient je buďto asymptomatický, nebo má farmakologicky kontrolovanou epilepsii. Indikované je vyšetření PET. Pokud prokáže nízkou metabolickou aktivitu, je diagnostikován nízkostupňový (st. II) gliom a pacienta je možné dále pouze klinicky sledovat a pravidelně vyšetřovat pomocí MR (metoda »watch and scan«) (obr. 51.). Má-li pacient jinou klinickou symptomatologii mimo epilepsii nebo zvyšuje-li léze signál po podání gadolinia, je nutná histologická verifikace (obr. 52.). Při lokalizaci léze v elokventní oblasti je vždy nutné před jakoukoli chirurgickou intervencí provést fMR. Je-li léze dosažitelná otevřenou chirurgickou cestou, je resekce vždy metodou volby, zatímco punkční biopsie by měla být vyhrazena jenom pro chirurgicky nedosažitelné léze. Jestliže histologie prokáže oligodendrogliální nádor, má být provedena genetická typizace nádoru. U maligních astrocytomů (st. III a IV) má po resekci nebo biopsii proběhnout konkomitantní chemoradioterapie v celkové dávce 60 Gy se současným podáváním temozolomidu a po ukončení radioterapie adjuvantní chemoterapie p.o. aplikovaným temozolomidem v šesti cyklech (viz výše). Při recidivě je nutné zvážit další chirurgickou resekci a po ní chemoterapii cytostatiky druhého sledu (lomustin). Anaplastické oligodendrogliomy (po genetické typizaci) mají být léčeny kombinací PCV ve dvou cyklech, a je-li dobrá odpověď na léčbu, prodloužit aplikaci o další až čtyři cykly. Po ukončení chemoterapie je indikovaná radiační léčba. Astrocytomy st. II, jsou-li symptomatické (za klinický příznak se v tomto případě nepovažuje farmakologicky korigovaná epilepsie! – viz výše), by měly být po operaci ozářeny. Otázka je kdy. Ihned po



Obr. 51. Difúzní astrocytom st. II, srovnání v T2 obraze (A vlevo) a PET mozku (A vpravo), srovnání v T2 obraze (B vlevo) a fúze PET-MR obrazu (B vpravo). V místě nádoru je přítomen hypometabolismus (A vpravo, B vpravo) (PET snímky publikovány s laskavým svolením doc. MUDr. O. Bělohávk, CSc., PET centrum Nemocnice Na Homolce, Praha)

operaci, nebo až v době, kdy se objeví další klinické symptomy, nebo v době, kdy je patrná progresie gliomu na MR? Mezi oběma modalitami není žádný rozdíl co do délky přežití (overall survival), ale u skupiny časné ozářených je prokazatelně prodloužena doba do objevení progresie (progression free survival). Na druhou stranu u nízkostupňových oligodendrogliomů není pooperační modalita přesněji definována, ale ukazuje se, že by měly být podobně chemosenzitivní jako jejich anaplastické varianty (Gutin, Posner, 2000).

Perspektivy léčby maligních gliomů

Přes velmi intenzivní a soustavné studium biologického chování anaplastických astrocytomů a glioblastomů a navzdory zdokonalování všech tří léčebných modalit nedošlo v průběhu posledních dvaceti let k žádnému zlepšení osudu nemocných, protože průměrná doba přežití u glioblastomu je stále kolem 12 měsíců a u anaplastických astrocytomů kolem 50 měsíců. Tato skutečnost vede k neustálému hledání perspektiv v léčebném postupu. Zatímco experimentální studie (*in vitro* a *in vivo*) přinášejí množství »slibných« informací, klinické zkoušky vycházejí zatím naprázdno. Sledované perspektivní možnosti lze rozdělit do následujících okruhů:

1. posílení senzitivity nádorových buněk k chemoterapii;
2. začlenění genové terapie a imunoterapie;
3. ovlivnění nádorové angiogeneze.

Snížit rezistenci nádorových buněk k chemoterapii lze např. použitím antagonisty P-glykoproteinu (PGP), který výrazně zvyšuje permeabilitu cytostatika hematoencefalickou bariérou. Jiným mechanismem, který zvyšuje senzitivitu k chemoterapii, je inaktivace enzymů (např. glutathion-S-transferázy – GST) působících deaktivaci BCNU a CCNU. Podobně efekt cytostatika temozolomidu snižuje enzym O⁶-alkylguanin-DNA-transferáza (AGAT, MGMT), který lze

inaktivovat O⁶-methylguaninem či O⁶-benzylguaninem. Pro potřeby zvýšení chemosenzitivity lze použít i genovou terapii – použitím adenovirového vektoru lze oslabit účinky regulátoru buněčného cyklu p21, který je aktivován pomocí p53, a navodit apoptózu. Genovou terapii obecně lze do léčebných perspektiv začlenit v tom smyslu, že může aktivovat supresorové geny nebo naopak inaktivovat onkogenní nebo konvergovat inaktivní formy účinné látky uvnitř nádorové buňky ve formy cytotoxické. Imunoterapeutické perspektivy spočívají například v použití monoklonálních protilátek proti nádorovým antigenům na receptorech růstových faktorů nebo mohou být použity jako antagonisté různých biologických funkcí nádorových buněk. K inhibici nádorové angiogeneze lze použít blokátory receptorů hlavních růstových faktorů, které angiogenezi indukují. Thalidomid blokuje receptory VEGF, suramin a protamin blokuje receptory PDGF a bFGF (Andratschke et al., 2001). Všechny možnosti uvedené pod body 1–3 jsou v současné době předmětem klinických zkoušek.

Podpořeno grantem IGA MZ ČR IA/8237-3.

1.4. Ependymální tumory

Tato skupina nádorů vyrůstá z ependymálních buněk, které tvoří stěny mozkových komor a centrálního míšního kanálu. Manifestují se především u dětí a mladých. Jejich morfologické rysy a biologické chování jsou značně měnlivé. V této skupině lze definovat tyto nádory:

- ependyom je nejčastěji se vyskytujícím ependymálním nádorem, lokalizován je obvykle intraventrikulárně a klinicky se projevuje obstrukcí likvorových cest;

4. Vlastní publikace

1. Publikace, které jsou podkladem disertace

a)

1. Kramář, Filip - Zemanová, Zuzana - Michalová, Kyra - Babická, Libuše - Ransdorfová, Šárka - Kozler, Petr a Netuka, David.

přehledový článek ve vědeckém / odborném časopise

Patogeneze mozkových gliomů - I. část. Úvod do problematiky, patogeneze astrocytárních nádorů. Pathogenesis of Brain Gliomas, Part. I: Introduction into the Pathogenesis of Astrocytic Tumors.

In: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, ČR, 1210-7859. 2006, 69/102, 5, s. 346-354. IF = 0.045

2. Kramář, Filip - Zemanová, Zuzana - Michalová, Kyra - Babická, Libuše - Ransdorfová, Šárka - Kozler, Petr a Netuka, David.

přehledový článek ve vědeckém / odborném časopise

Patogeneze mozkových gliomů, II. Část: Patogeneze oligodendrogliomů a gliomů v rámci dědičných onemocnění. Pathogenesis of brain gliomas, Part II.: Pathogenesis of oligodendrogliomas and gliomas within hereditary disorders. In: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, ČR, 1210-7859. 2006, 69/102, 6, s. 419-425. IF = 0.045

3. Zemanová, Zuzana - Kramář, Filip - Babická, Libuše - Ransdorfová, Šárka - Melicherčíková, Jela - Hrabal, Petr - Kozler, Petr a Michalová, Kyra.

původní článek ve vědeckém / odborném časopise

Molecular cytogenetic stratification of recurrent oligodendrogliomas: utility of interphase fluorescence *in-situ* hybridization (I-FISH). Molekulárně cytogenetická strategie u oligodendrogliomů: využití interfázni fluorescenční *in-situ* hybridizace.

In: Folia Biologica (Praha), ČR, 0015-5500. 2006, 52, 3, s. 71-78. IF = 0.387

4. Kramář, Filip - Zemanová, Zuzana - Michalová, Kyra - Babická, Libuše - Ransdorfová, Šárka - Hrabal, P. a Kozler, Petr.

původní článek ve vědeckém / odborném časopise

Cytogenetic analyses in 81 patients with brain gliomas: correlation with clinical outcome and morphological data. Cytogenetická analýza u 81 pacientů s gliomy mozku: korelace s výsledky a morfologickými daty.

In: Journal of Neurooncology, USA, 0167-594X. 2007, 84, 2, s. 201-211. IF = 1.848

b)

1. Kramář, Filip - Zemanová, Zuzana.

autor kapitoly (monografie)

Genové abnormality u nádorů centrální nervové soustavy. - Genome Abnormalities in Central Nervous System Tumors. - Petr Kozler - Eva Havrdová - Alena Zumrová et al: In: Neurologie 2005. ČR, Praha, 2005, s. 51-59. 1. vydání, Triton.

2. Kozler, Petr - Kramář, Filip.

autor kapitoly (monografie)

Familiární nádorové syndromy postihující nervový systém. – Familial tumor syndromes affecting nervous system. - Petr Kozler et al: In: Intrakraniální nádory. ČR, Praha, 2007, s. 175-182. 1. vydání, Galén

3. Kramář, Filip.

autor kapitoly (monografie)

Léčebný postup u gliomů. – Medical treatment of brain gliomas. - Petr Kozler et al: In: Intrakraniální nádory. ČR, Praha, 2007, s. 79-84. 1. vydání, Galén

Abstrakta:

1. Kramář, Filip - Zemanová, Zuzana - Michalová, Kyra - Babická, Libuše - Kozler, Petr a Netuka, David.

abstrakt ve sborníku

Klinický význam genetických změn v buňkách gliálních nádorů.

In: Abstrakta. ČR, Praha, 2007, s. 20-21. Kuncův Memorial 2007. ČR, Praha, 15.-16.3.2007.

Česká neurochirurgická společnost, Společnost pro rozvoj a podporu neurochirurgie.

MZ00000064165

2. Kramář, Filip - Zemanová, Zuzana - Michalová, Kyra - Babická, Libuše - Kozler, Petr a Netuka, David.

abstrakt ve sborníku

Prediktivní význam chromosomálních aberací zjištěných metodou I-FISH v buňkách mozkových gliomů.

In: Abstrakta. ČR, Hradec Králové, 2007, s. 23-24. Pracovní dny České Neurochirurgické Společnosti ČLS JEP s mezinárodní účastí. ČR, Špindlerův Mlýn - Bedřichov, 13.-15.6.2007.

Česká neurochirurgická společnost.

3. Zemanová, Zuzana - Michalová, Kyra - Babická, Libuše - Ransdorfová, Šárka – Melicherčíková, Jela - Kramář, Filip - Hrabal, Petr a Kozler, Petr.

abstrakt ve sborníku

Contribution of molecular cytogenetic analyses to diagnosis and treatment of malignant brain tumors. In: Abstracts. Francie, Le Grande Motte, 2006, s. 10-10. 10th European Workshop of molecular Cytogenetics in Human Solid Tumors. Francie, Le Grande Motte, 8.-11.6.2006.

LC535, MZ0VFN2005, MZO 00064165, 1A8237

4. Kramář, Filip - Zemanová, Zuzana - Michalová, Kyra - Ransdorfová, Šárka - Babická, Libuše - Šindelářová, Lenka - Březinová, Jana - Kozler, Petr a Netuka, David.

abstrakt konferenčního příspěvku ve vědeckém / odborném časopise

Molecular Cytogenetic Analysis and Malignant Brain Tumor Cells.

In: Neuro-Oncology, USA, 1522-8517. 2006, 8, 4, s. 326-326. 7th Congress of the European Association for Neuro-Oncology (EANO). Rakousko, Vídeň, 14.-17.9.2006.

. IF = 4.939 (2006),

MZ0VFN2005, MZO 00064165, 1A8237

5. Kramář, Filip - Zemanová, Zuzana - Michalová, Kyra - Ransdorfová, Šárka - Babická, Libuše - Šindelářová, Lenka - Březinová, Jana - Kozler, Petr a Netuka, David.

abstrakt ve sborníku

Molecular cytogenetic analysis of malignant brain tumor cells (1).

In: Abstracts. Rakousko, 2006, s. 1-1. 7th Congress of the European Association for Neuro Oncology. Rakousko, Vídeň, 14.-17.9.2006.

MZ0VFN2005, MZO 00064165, 1A8237

6. Kramář, Filip - Zemanová, Zuzana - Michalová, Kyra - Ransdorfová, Šárka - Babická,

Libuše - Šindelářová, Lenka - Březinová, Jana - Kozler, Petr a Netuka, David.
abstrakt ve sborníku

Molecular cytogenetic analysis of malignant brain tumor cells (2).

In: Proceedings. Maďarsko, 2006, s. 1-1. 4th CENS Meeting. Maďarsko, Budapešť, 13. 15.10.2006.

LC535, MZ0VFN2005, MZO 00064165, 1A8237

7. Kramář, Filip - Zemanová, Zuzana - Ransdorfová, Šárka - Babická, Libuše - Pavlišťová, Lenka et al.

abstrakt ve sborníku

Molekulárně cytogenetická analýza buněk mozkových nádorů.

Petr Kozler - Filip Kramář (Eds.): In: Abstrakta. ČR, Praha, 2006, s. 24-25. Kuncův Memorial 2006 - Česká Neurochirurgická Společnost. ČR, Praha, 16.-17.3.2006. Neurochirurgická klinika ÚVN.

1A8237

8. Michalová, Kyra - Zemanová, Zuzana - Babická, Libuše - Ransdorfová, Šárka - Kramář, Filip - Hrabal, Petr a Kozler, Petr.

abstrakt ve sborníku

Molecular cytogenetic analysis of malignant brain tumor cells.

Lyn Griffiths (Ed.): In: Book of abstracts. Austrálie, 2006, s. 1-1. 11th International Congress of Human Genetics. Austrálie, Brisbane, 6.-10.8.2006. Human Genetics Society of Australasia.

MZ0VFN2005, MZO 00064165, 1A8237

9. Zemanová, Z. - Babická, L. - Kramář, Filip - Ransdorfová, Šárka - Šindelářová, L. – Březinová, J. - Hrabal, P. - Kozler, Petr - Michalová, Kyra.

abstrakt příspěvku ve sborníku

Molekulárně cytogenetická analýza buněk mozkových tumorů. -

In: Abstrakta. ČR, Brno, 2005, 38.výroční konference Cytogenetické sekce, Kancelář veřejného ochránce práv. ČR, Brno, 8.-9.9.2005. Cytogenetická sekce Čs.biologické společnosti, Společnost lékařské genetiky ČLS JEP, Centrum biostatistiky a analýz.

MZ00000064165, 1A8237,

10. Zemanová, Zuzana - Babická, Libuše - Ransdorfová, Šárka - Pavlišťová, Lenka - Kramář, Filip - Hrabal, Petr - Kozler, Petr - Michalová, Kyra.

abstrakt konferenčního příspěvku ve vědeckém / odborném časopise

Molecular cytogenetic analyses of malignant brain tumour cells. - molekulárně cytogenetická analýza buněk maligních mozkových nádorů.

In: Journal of Applied Biomedicine, ČR, 1214-021X. 2005, 13, Suppl. 1, s. 198-198. 18. Biologické dny. ČR, České Budějovice, 24.-26.10.2005.

1A8237

11. Zemanová, Zuzana - Michalová, Kyra - Ransdorfová, Šárka - Babická, Libuše - Šindelářová, Lenka - Březinová, Jana - Kramář, Filip - Kozler, Petr.

abstrakt konferenčního příspěvku ve vědeckém / odborném časopise

Molecular cytogenetic analyses of malignant brain tumour cells. - Molekulárně cytogenetická analýza buněk maligních mozkových nádorů.

In: European Journal of Human Genetics, Velká Británie, 1018-4813. 2005, 13, Suppl. 1, s. 198-198. European Human Genetics Conference 2005. Praha, ČR, 7.-10.5.2005.

IF = 3.251

MZ00000064165, 1A8237

12. Zemanová, Zuzana - Michalová, Kyra - Ransdorfová, Šárka - Babická, Libuše - Šindelářová, Lenka - Březinová, Jana - Kramář, Filip - Kozler, Petr.
abstrakt konferenčního příspěvku ve vědeckém / odborném časopise
Molecular cytogenetic analyses of malignant brain tumour cells. -
In: Chromosome Research, Nizozemí, 0967-3849. 2005, 13, 1, s. 88-88. 5th European Cytogenetics Conference. Španělsko, Madrid, 4.-7.6.2005.
IF = 3.007
1A8237

13. Babická, Libuše - Zemanová, Zuzana - Kramář, Filip - Ransdorfová, Šárka - Hrabal, Petr – Kozler, Petr - Michalová, Kyra.
abstrakt ve sborníku
Molekulárně cytogenetická analýza buněk difuzních gliomů a její přínos pro diagnostiku a léčbu. ČR, Brno, 2006, s. 231-231. Brněnské onkologické dny. ČR, Brno, 11.-13.5.2006.
MZ0VFN2005, MZO 00064165, 1A8237

14. Babická, Libuše - Zemanová, Zuzana - Kramář, Filip - Ransdorfová, Šárka - Melicherčíková, Jela - Hrabal, Petr - Kozler, Petr - Michalová, Kyra.
abstrakt ve sborníku
Význam molekulárně cytogenetické analýzy nádorových buněk pro diagnostiku a léčbu oligodendrogliomů (2). In: Sborník abstraktů. ČR, Olomouc, 2006, s. 36-36. 2. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. ČR, Olomouc, 7.- 9.12.2006. Solen. 80-239-8240-0
MZ0VFN2005, MZO 00064165, 1A8237

15. Babická, Libuše - Zemanová, Zuzana - Kramář, Filip - Ransdorfová, Šárka - Melicherčíková, Jela - Hrabal, Petr - Kozler, Petr - Michalová, Kyra.
abstrakt ve sborníku
Význam molekulárně cytogenetické analýzy nádorových buněk pro diagnostiku a léčbu oligodendrogliomů (1). In: Sborník. ČR, Praha, 2006, s. 1-1. 7. studentská vědecká konference 1.LF UK. ČR, Praha, 22.5.2006. Galén.
MZ0VFN2005, MZO 00064165, 1A8237

16. Kramář, Filip – Zemanová, Zuzana – Babická, Libuše – Michalová, Kyra – Ransdorfová, Šárka – Beneš, Vladimír – Netuka, David.
abstrakt ve sborníku
Prediktivní význam cytogenetických změn na celkovou dobu přežití u mozkových oligodendrogliomů,
Výroční kongres České neurochirurgické společnosti, ČR, Frymburk, 2-4.11.2011

2. publikace bez vztahu k tématu dizertace

a) s IF

1. Halliday, Alison - Harrison, Michael – et al - Beneš, Vladimír - Kramář, Filip a kol.
původní článek ve vědeckém / odborném časopise, multicentrická studie
10-year stroke prevention after successful carotid endarterectomy for asymptomatic stenosis (ACST-1): a multicentre randomised trial.. 10-ti letá prevence mrtvice po úspěšné karotické endarterektomie u asymptomatické stenózy (ACST-1): multicentrická randomizovaná studii.
In: Lancet. Velká Británie, 0140-6736. 2010, 376, 9746, s. 1074-1084. IF = 33.633

2. Beneš, Vladimír - Bradáč, Ondřej - Ostrý, Svatopluk - Buchvald, P - Kramář, Filip - Kaiser, M. - Suchomel, P. - Beneš, Vladimír.
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Intramedulární astrocytom - série 15 pacientů a přehled literatury. Intramedullary Astrocytoma - a Series of 15 Patients and Literature Overview.
In: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie. Česká republika, 1210-7859. 2010, 73/106, 2, s. 169-177. IF = 0.393
3. Netuka, David - Masopust, Václav - Belšán, Tomáš - Kramář, Filip - Beneš, Vladimír.
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
První zkušenosti s použitím intraoperační MR při resekcích adenomů hypofýzy. Early Experience with Intraoperative MRI Scanning during Pituitary Adenoma Resection.
In: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie. Česká republika, 1210-7859. 2009, 72, 1, s. 45-50. IF = 0.246
4. Beneš, Vladimír III - Kramář, Filip - Hrabal, Petr - Kaiser, M - Buchvald, Pavel
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Maligní tumor z pochvy periferního nervu - dvě kazuistiky. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor - Two Case Reports.
In: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie. Česká republika, 1210-7859. 2009, 72, 2, s. 163-167. IF = 0.246
5. Kozler, Petr - Beneš, Vladimír - Netuka, David - Kramář, Filip - Hrabal, Petr. - Charvát, František.
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Chordoid meningioma: presentation of two case reports; review of the literature, and plea for data standardisation. Chordoidní meningiom: prezentace dvou případů; přehled o literatuře, a žádost o data standardizace.
In: Journal of Neurooncology. Spojené státy americké, 0167-594X. 2008, 88, 1, s. 115-120. IF = 2.323
6. Beneš, Vladimír - Netuka, David - Charvát, František - Mohapl, Milan - Kramář, Filip - Ostrý, Svatopluk - Mašková, Jana - Lacman, Jiří.
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Stenóza vnitřní krkavice - endarterektomie nebo stent?. Carotid Artery Stenosis - Endarterectomy or Stenting?.
In: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie. Česká republika, 1210-7859. 2008, 71/104, 4, s. 388-397. IF = 0.319
NR9435
7. Beneš, Vladimír - Netuka, David - Charvát, František - Mohapl, Milan - Kramář, Filip - Ostrý, Svatopluk - Mašková, Jana - Lacman, Jiří.
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Srovnání karotické endarterektomie a stentingu - výsledky jednoho pracoviště. Results of a Comparison between Carotid Endarterectomy and Carotid Stenting - Single Institution Experience.
In: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie. Česká republika, 1210-7859. 2008, 71/104, 4, s. 400-404. IF = 0.319
NR9435

8. Ostrý, Svatopluk - Stejskal, Lubor - Kramář, Filip - Netuka, David - Mohapl, Milan - Beneš, Vladimír.

původní článek ve vědeckém / odborném časopise

Hypercapnia Impact on Vascular and Neuronal Reactivity in Patients Before and After Carotid Endarterectomy. Vliv hyperkapnie na cévní a neuronální reaktivitu u pacientů před a po karotické endarterektomii.

In: Zentralblatt für Neurochirurgie, Německo, 0044-4251. 2007, 68, 2, s. 59-66.

IF = 0.542

NR9435

9. Kozler, Petr - Beneš, Vladimír - Netuka, David - Kramář, Filip - Charvát, František.

původní článek ve vědeckém / odborném časopise

Preoperative neuroimage findings as a predictor of postoperative neurological deficit in intracranial meningiomas. Přeoperační zobrazovací vyšetření predikující pooperační neurologický deficit u intrakraniálních meningiomů.

In: Zentralblatt für Neurochirurgie, Německo, 0044-4251. 2007, 68, 4, s. 190-194.

IF = 0.542

10. Mohapl, Milan - Kramář, Filip - Beneš, Vladimír.

původní článek ve vědeckém / odborném časopise

Hydrocefalus po subarachnoidálním krvácení - vliv modality léčby aneurytmatu.

Hydrocephalus after Subarachnoidal Hemorrhage - The Effects of Therapeutical Modalities for Aneurysm. In: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, ČR, 1210-7859. 2007, 70/103, 3, s. 284 -289.

IF = 0.045

NR9436

11. Beneš, Vladimír - Bradáč, Ondřej - Ostrý, Svatopluk - Buchvald, P - Kramář, Filip - Kaiser, Miroslav. - Suchomel, Petr. - Beneš, Vladimír.

původní článek ve vědeckém / odborném časopise

Intramedulární astrocytom - série 15 pacientů a přehled literatury. Intramedullary

Astrocytoma - a Series of 15 Patients and Literature Overview.

In: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie. Česká republika, 1210-7859. 2010, 73/106, 2, s. 169-177. IF = 0.393

12. Netuka, David – Ostrý, Svatopluk – Belšán, Tomáš – Kramář, Filip – Beneš, Vladimír.

původní článek ve vědeckém / odborném časopise

Intraoperative MR imaging in a case of a cervical spinal cord lesion. Intraoperační MR vyšetření u pacienta s míšní lézí.

J Neurosurg Spine. 2011 Jun;14(6):754-7. Epub 2011 Mar 18. IF = 1.594

b) bez IF

1. Kramář, Filip.

autor kapitoly, monografie

Neurochirurgie basálních ganglií. Neurosurgery of basal ganglia. s. 318-325

In: Klinická neuroanatomie CNS s aplikovanou neurologií a neurochirurgií. 1. vyd. Praha: Triton, 2008. 628. 978-80-7387-039-3, . Počet výtisků: 100

NR8931

2. Kramář, Filip:
autor kapitoly, monografie
Monitorační techniky u cévních onemocnění mozku a míchy.
Lubor Stejskal (Ed.): In: Intraoperační stimulační monitorace v neurochirurgii. ČR, Praha, 2006, s. 63-78. 1. vydání, Grada. 80-247-0964-3
3. Kramář, Filip
autor 10 kapitol, monografie
Vladimír Beneš et al: In: Ischémie mozku. ČR, Praha, 2003, s. 198. 1. vydání, Galén. 80-7262-186-6
4. Kramář, Filip – Zoul, Josef – Mohapl, Milan – Beneš, Vladimír
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Monitorace nemocných během karotické endarterektomie.
Monitoring of patients during carotid endarterectomy.
Čes.a Slov. Neurol Neurochir. 62/95, 99 č.4 p 197-202
5. Stejskal, Lubor – Kramář, Filip
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Normativní latence H-reflexu n. tibialis.
Normative latencies of the H-reflex n. tibialis.
Klinická neurofyzilogie, vol 7, č.18, str. 9-15, 1999
6. Beneš, Vladimír – Kramář, Filip
původní článek
Chirurgické a intervenční řešení ischemie mozku.
Surgical and interventional treatment of cerebral ischemia.
Lékařské Listy XLIX, č. 39, s. 7-10
7. Kramář, Filip – Beneš, Vladimír.
Zpráva ze sjezdu společnosti Cerebrovaskulární sekce Americké neurochirurgické asociace (AANS), Americké neurochirurgické společnosti (ANS) a Americké společnosti intervenční a léčebné neuroradiologie (ASITN).
Report from the meeting of Cerebrovascular section of American Association of Neurosurgeons, American Neurosurgical Society, American Society of Interventional Neuroradiology.
6.-9.2.2000 v New Orleans, USA.
Čes. a Slov. Neurol. Neurochir. 63/96, p. 312-313
8. Beneš, Vladimír - Mohapl, Milan - Kramář, Filip a Neumann, Jiří
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Reconstructive surgery in cerebral ischemia: extracranial.
In: Advances in Clinical and Experimental Medicine, Polsko, 1230-025X, 2000, 9, 4, Suppl.1, s. 33-40, 4, Suppl.1, IGA MZ ČR 3902-3
9. Mohapl, Milan - Kramář, Filip - Stejskal, Lubor - Beneš, Vladimír
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Ischémie mozku a její neurochirurgické řešení.
Cerebral Ischemia and its Neurosurgical Treatment.
In: Časopis lékařů českých, ČR, 0008-7335, 2000, 8, s. 249.8,

IGA MZ ČR 5743-3, IGA MZ ČR 5744-3

10. Häckel, Martin - Stejskal, Lubor - Kramář, Filip.
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Přední krční korpektomie při řešení víceetážových degenerativních stenóz se spondylogenní myelopatií. Zkušenosti s léčbou a přehled literatury.
Anterior Cervical Corpectomy in Treatment of Multilevel Degenerative Stenoses with Spondylogenic Myelopathy.(Experience with Treatment and Review of Literature) .
In: Rozhledy v chirurgii, ČR, 0035-9351, 2001, 80, 4, s. 163-169.
IGA MZ ČR 6239-3

11. Kramář, Filip.
původní článek
Best Medical Treatment.
In: Lékařské Listy, ČR, 2001, 39, s. 18-21.

12. Kramář, Filip - Beneš, Vladimír a Mohapl, Milan
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Doppler scanning v chirurgii aneurysmat.
Doppler Scanning in Surgery of Aneurysms.
In: Rozhledy v chirurgii, ČR, 0035-9351, 2001, 80, 1, s. 9-11.
IGA MZ ČR 5744-3, IGA MZ ČR 5743-3

13. Kramář, Filip - Mohapl, Milan a Beneš, Vladimír
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Diagnostika smrti mozku pomocí TCD.
Diagnosis of Brain Death with TCD.
In: Anesteziologie a neodkladná péče, ČR, 0862-4968, 2001, 12, 3, s. 145-147.
J13/98: 1111 0000 1/026016-04, IGA MZ 5743-3, IGA MZ 5744-3

14. Stejskal, Lubor - Kramář, Filip - Mohapl, Milan a Beneš, Vladimír
původní článek ve vědeckém / odborném časopise
Somatosenzorické evokované odpovědi na medianus před a po karotické endarterektomii.
Somatosensory Evoked Responses of the Median Nerve before and after Carotid Endarterectomy.
In: Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, ČR, 1210-7859, 2001, 64/97, 2, s. 114-123.
IGA MZ ČR 5743-3

Abstrakta:

1. Kramář, Filip – Mohapl, Milan – Tomáš, Robert – Stejskal, Lubor – Beneš, Vladimír
abstrakt ve sborníku
Monitorace nemocných během karotické endarterektomie.
Prac.dny ČNCHS,Ústí n.L.,P.21.1998.

2. Kramář, Filip – Mohapl, Milan – Tomáš, Robert – Stejskal, Lubor – Beneš, Vladimír
abstrakt konferenčního příspěvku ve vědeckém / odborném časopise
Monitorace nemocných během karotické endarterektomie.
Čes a Slov Neurol Neurochir. 61/94, Suppl.1:10.1998.

3. Häckel, Martin – Masopust, Václav – Kramář, Filip
abstrakt ve sborníku
Chronický subdurální hematoma – vývoj terapeutického přístupu.
Chronic subdural haematoma - development of the treatment methods.
Pracovní dny České neurochirurgické společnosti
Plzeň 16.-18.9.1999, Prog Abs 22, 1999
4. Kramář, Filip – Mohapl, Milan – Beneš, Vladimír
abstrakt ve sborníku
Doppler scanning v karotické endarterektomii.
XXVII. Slovenské a České neurovaskulárne sympóziium
Bratislava, 19.-20.11.1999, Prog. a Abstr., str. 46
5. Kramář, Filip – Stejskal, Lubor - Mohapl, Milan – Beneš, Vladimír
abstrakt ve sborníku
Monitorace SEP n. medianus v průběhu karotické endarterektomie.
XXVII. Slovenské a České neurovaskulárne sympóziium Bratislava, 19.-20.11.1999
Prog. a Abstr. str. 47-48
6. Kramář, Filip – Beneš, Vladimír – Mohapl, Milan
abstrakt konferenčního příspěvku ve vědeckém / odborném časopise
Doppler scanning in carotid surgery.
8th European Stroke Conference
Venice, Italy, April 7.-10.1999, Cerebrovascular Diseases 9 (suppl.1)
Abstr. str. 80
7. Kramář, Filip – Stejskal, Lubor - Mohapl, Milan – Beneš, Vladimír
abstrakt konferenčního příspěvku ve vědeckém / odborném časopise
Median somatosensory evoked potentials monitoring during carotid microendarterectomy.
Clinical Neurophysiology, vol. 110 Suppl 1, September 1999, str. 84
8. Stejskal, Lubor – Štětkařová, Ivana – Kramář, Filip
abstrakt konferenčního příspěvku ve vědeckém / odborném časopise
Significance of the "prerolandic response" in cortical somatosensory evoked potentials of the median nerve.
Clinical Neurophysiology, vol. 110 Suppl 1, September 1999, str. 139
9. Kramář, Filip – Stejskal, Lubor - Mohapl, Milan – Beneš, Vladimír
abstrakt konferenčního příspěvku ve vědeckém / odborném časopise
Median somatosensory evoked potentials monitoring during carotid endarterectomy.
Journal of Neurosurgery 92, vol. 1: s. 227
IGA MZ 5743-3, JI3/98:111100002-1
10. Mohapl, Milan - Kramář, Filip – Beneš, Vladimír
abstrakt ve sborníku
Extra-intracranial arteriary bypass in cerebral ischemia treatment.
Joint Meeting of the AANS/CNS Section on Cerebrovascular Surgery and the American Society of Interventional and Therapeutic Neuroradiology, New Orleans Hilton Riverside,
6.-9. February, 2000
Abstr. p. 81-82
11. Beneš, Vladimír - Mohapl, Milan - Kramář, Filip
abstrakt ve sborníku
Carotid endarterectomy - asymptomatic patient versus asymptomatic vessel.

Joint Meeting of the AANS/CNS Section on Cerebrovascular Surgery and the American Society of Interventional and Therapeutic Neuroradiology, New Orleans Hilton Riverside, 6.-9. February, 2000
Abstr. p. 96

12. Kramář, Filip – Stejskal, Lubor - Mohapl, Milan – Beneš, Vladimír
abstrakt ve sborníku
Median SEP monitoring during carotid endarterectomy.
Joint Meeting of the AANS/CNS Section on Cerebrovascular Surgery and the American Society of Interventional and Therapeutic Neuroradiology, New Orleans Hilton Riverside, 6.-9. February, 2000
Abstr. p. 98
Median SEP, carotid endarterectomy.

13. Kramář, Filip – Stejskal, Lubor - Mohapl, Milan – Beneš, Vladimír
abstrakt ve sborníku
Monitorace SEP n. medianus během karotické endarterektomie
Median SEP monitoring during carotid endarterectomy.
Neuro-surgery critical care imaging, Harrachov 23.-26.3.2000
Abstr. str. 20

14. Kramář, Filip – Beneš, Vladimír - Stejskal, Lubor
abstrakt ve sborníku
Monitoring při cévních operacích mozku, neuroprotektce.
Postgraduální kurz v cévní neurochirurgii, Hradec Králové
Sborník abstrakt s. 44-46

15. Kozler, Petr – Beneš, Vladimír – Plas, Jaroslav – Kramář, Filip
abstrakt ve sborníku
Neurinom akustiku st. IV. - chirurgická léčba na naší klinice v letech 1998-1999.
Pracovní dny České neurochirurgické společnosti, Zlín 2000
CD ROM

16. Mohapl, Milan – Kramář, Filip
abstrakt ve sborníku
Stimulace cerebrovaskulární rezervní kapacity hyperkapnií.
Pracovní dny České neurochirurgické společnosti, Zlín 2000
CD ROM

17. Kramář, Filip – Stejskal, Lubor – Beneš, Vladimír – Kozler, Petr – Plas, Jaroslav
abstrakt ve sborníku
Monitorace funkce n. VII při operaci neurinomu akustiku IV. stupně.
Pracovní dny České neurochirurgické společnosti, Zlín 2000
CD ROM

18. Kramář, Filip - Stejskal, Lubor - Beneš, Vladimír - Mohapl, Milan
abstrakt ve sborníku
Somatosenzorické evokované potenciály n.medianus v karotické endarterektomii.
SEP of N.Medianus in Carotid Endarterectomy.
XXIX.slovenské a České neurovaskulárne sympóziu. SR, Bratislava, 2001
J13/98: 1111 0000 1/026016-04, IGA MZ 5743-3, IGA MZ 5744-3

19. Mohapl, Milan - Kramář, Filip - Netuka, David
abstrakt ve sborníku
Vyšetření cerebrovaskulární rezervní kapacity použitím hyperkapnie.
CVRC Diagnostics using Hypercapnia.
XXIX.slovenské a České neurovaskulárne sympóziu. SR, Bratislava, 2001
J13/98: 1111 0000 1/026016-04, IGA MZ 5743-3, IGA MZ 5744-3
20. Plas, Jaroslav - Häckel, Martin - Preis, Jiří - Kramář, Filip - Netuka, David
abstrakt ve sborníku
Klasifikace výhřezu meziobratlové bederní ploténky z pohledu neurochirurga.
Neurosurgical Classification of Lumbar Disc Herniations.
Pracovní dny České neurochirurgické společnosti. České Budějovice, 2001
J13/98: 1111 0000 1/026016-04
21. Kramář, Filip - Netuka, David - Belšan, Tomáš – Beneš, Vladimír - Ostrý, Svatopluk – Mohapl, Milan – Hořínek, Daniel
abstrakt ve sborníku
Our experience with glial tumors in "image guided" surgical suite.
German Society of Neurosurgery Joint Meeting with the Austrian Neurosurgical Society, Czech Neurosurgical Society and Slovak Neurosurgical Society, Garmisch-Partenkirchen, Germany, 2010
22. Belšan, Tomáš – Netuka, David – Vrána, Jiří – Kramář, Filip – Beneš, Vladimír
abstrakt ve sborníku
Our problems in intraoperative MR imaging interpretation.
2nd Meeting of Intra-Operative Imaging Society, Turkey, Istanbul, 2009
23. Netuka, David – Masopust, Václav – Belšan, Tomáš – Kramář, Filip – Beneš, Vladimír
abstrakt ve sborníku
Intraoperative 3.T MRI scanning in endoscopic endonasal pituitary adenoma surgery - our experience.
2nd Meeting of Intra-Operative Imaging Society, Turkey, Istanbul, 2009
24. Beneš, Vladimír - Netuka, David — Kramář, Filip - Belšan, Tomáš
abstrakt ve sborníku
One year experience with multifunctional surgical suite (MFSS). Our problems in intraoperative MR imaging interpretation.
2nd Meeting of Intra-Operative Imaging Society, Turkey, Istanbul, 2009
25. Beneš, Vladimír - Netuka, David — Kramář, Filip – Charvát, František
abstrakt ve sborníku
Overview of intraoperative MRI.
9th Congress of the European Skull Base Society, Netherlands, Rotterdam, Apr 15-18, 2009
26. Beneš, Vladimír - Netuka, David — Kramář, Filip - Belšan, Tomáš
abstrakt ve sborníku
Intraoperační MR – přehled.
Overview of intraoperative MRI.
Pracovní dny České neurochirurgické společnosti, Zámek Štířín, 2009

27. Kramář, Filip - Netuka, David - Beneš, Vladimír - Belšan, Tomáš
abstrakt ve sborníku
Naše zkušenosti s gliálními nádory mozku a míchy na multifunkčním operačním sále.
Our Experience in gliomas in "image guided" surgical suite.
Pracovní dny České neurochirurgické společnosti, Zámek Štířín, 2009
28. Kramář, Filip - Netuka, David - Beneš, Vladimír
abstrakt ve sborníku
Nové trendy v léčbě high-grade gliomů
New trends in high-grade gliomas treatment.
Pracovní dny České neurochirurgické společnosti, Zámek Štířín, 2009
29. Kozler, Petr – Beneš, Vladimír – Kramář, Filip – Netuka, David – Charvát, František -
Hrabal, Petr
abstrakt ve sborníku
Nitrolební meningiomy
Intracranial Meningiomas
Pracovní dny České neurochirurgické společnosti, Zámek Štířín, 2009
30. Beneš, Vladimír III - Bradáč, Ondřej – Ostrý, Svatopluk – Buchvald, Pavel – Kramář,
Filip
abstrakt ve sborníku
Intramedulární astrocytom - soubor 15 pacientů
Intramedullary Astrocytoma – a Series of 15 Patients
Pracovní dny České neurochirurgické společnosti, Zámek Štířín, 2009
31. Netuka, David - Masopust, Vaclav - Kramar, Filip - Belsan, Tomas – Benes, Vladimír
abstrakt ve sborníku
Application of iMRI in endoscopic procedures in non-pituitary skull base lesions
3rd Meeting of the Intraoperative Imaging Society IOIS,
Zürich, Switzerland, 16-19 January 2011
32. Kramar, Filip - Netuka, David - Belsan, Tomas - Benes, Vladimír - Ostry, Svatopluk -
Mohapl, Milan - Horinek, Daniel – Masopust, Vaclav
abstrakt ve sborníku
Our experience with glial tumors in image-guided surgical suite: A consecutive series of 226 surgeries
3rd Meeting of the Intraoperative Imaging Society IOIS,
Zürich, Switzerland, 16-19 January 2011
31. Kramář, Filip - Netuka, David - Belšan, Tomáš – Beneš, Vladimír
abstrakt ve sborníku
A prospective study of the intraoperative mri impact on the extent of high grade gliomas
resection
EANS 2011, 14th European Congress of Neurosurgery
Rome, Italy, 9-14 October 2011
32. Kramář, Filip - Netuka, David - Belšan, Tomáš – Beneš, Vladimír
abstrakt ve sborníku
A prospective study of the intraoperative mri impact on the extent of low grade gliomas
resection

EANS 2011, 14th European Congress of Neurosurgery
Rome, Italy, 9-14 October 2011